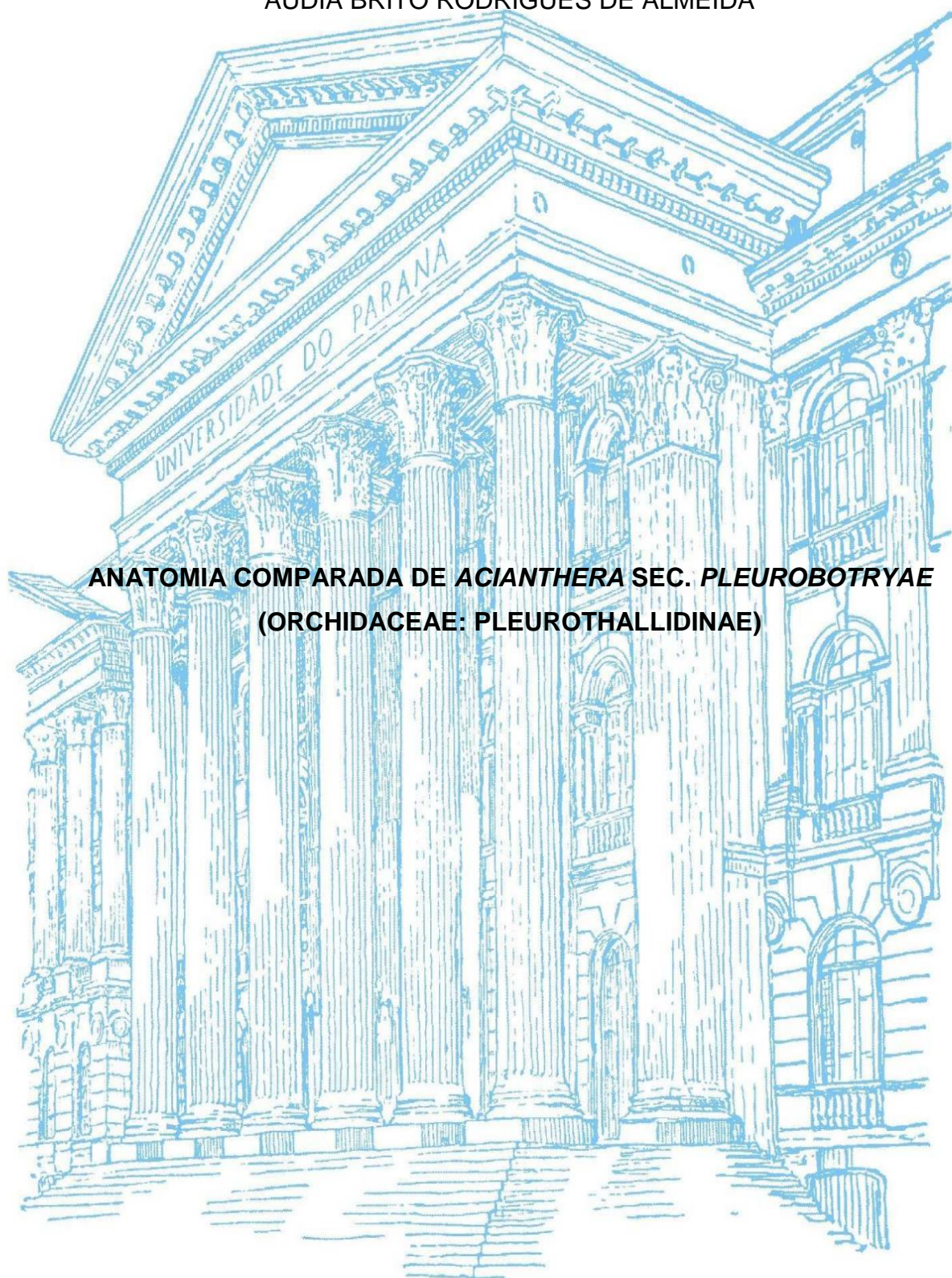


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AUDIA BRITO RODRIGUES DE ALMEIDA



**ANATOMIA COMPARADA DE ACIANTHERA SEC. PLEUROBOTRYAE  
(ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE)**

CURITIBA

2016

AUDIA BRITO RODRIGUES DE ALMEIDA

**ANATOMIA COMPARADA DE *ACIANTHERA* SEC. *PLEUROBOTRYAE*  
(ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE)**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica, no Programa de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Erika Amano  
Co-orientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Almeida, Audia Brito Rodrigues de  
Anatomia comparada de *Acianthera* sec. *Pleurobotryae* (Orchidaceae:  
Pleurothallidinae) / Audia Brito Rodrigues de Almeida. – Curitiba, 2016.  
81 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Erika Amano  
Coorientador: Eric de Camargo Smidt

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Orquidea 2. Anatomia vegetal 3. Folhas – Anatomia 4. Nectários I.  
Título II. Amano, Erika III. Smidt, Eric de Camargo IV. Universidade  
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Botânica.

CDD (20. ed.) 584.15



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Setor de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica



**“ANATOMIA COMPARADA DE ACIANTHERA SEC.  
PLEUROBOTRYAE (ORCHIDACEAE:  
PLEUROTHALLIDINAE)”.**

por

**Audia Brito Rodrigues de Almeida**

Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Mestre no Programa  
de Pós-Graduação em Botânica, pela Comissão  
formada pelos doutores

  
Dr.ª Érika Amano – (Presidente/Orientador)

  
Dr.ª Poliana Ramos Cardoso

  
Dr.ª Viviane da Silva Pereira

Curitiba, 15 de dezembro de 2016.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, por sua bondade e por ter me dado forças para superar os obstáculos encontrados.

A minha família, especialmente aos meus pais, por todo o amor, cuidado, carinho, pela confiança em mim depositada. Serei eternamente grata pela pessoa que sou e por tudo o que conquistei até aqui, tenham certeza que o apoio de vocês foi fundamental em minha vida.

Ao meu esposo, João Paulo, por seu amor, carinho, companheirismo, paciência e incentivo, pois sem isso com certeza eu não teria conseguido.

A Lucilene, Manoel, Wesley e Belinha minha segunda família, por acolherem-me quando mais precisei e pela paciência que tiveram comigo.

A minha querida professora Maria Laura Assef, minha grande incentivadora e além de tudo amiga, pelos seus bons conselhos, pelas broncas e pelo carinho que tem por mim.

A minha orientadora, professora Érika Amano, pela dedicação, pelo apoio, pelos conselhos, pela confiança em mim depositada desde o primeiro dia em que nos encontramos, por confiar em meu trabalho e acima de tudo pela paciência que teve comigo nos últimos dois anos. Pelo seu ombro amigo em dias difíceis e pela sua firmeza nos momentos em que eu estava sem forças e desacreditada. Sua ajuda foi de extrema importância e serei sempre grata por isso.

Ao meu co-orientador, professor Eric Smidt, pela atenção e paciência, pelo apoio, pela confiança e acima de tudo por todo o conhecimento compartilhado comigo neste tempo de convivência.

Aos meus professores e colegas Luiz Antônio Acra e Rodrigo Kersten, pois foram eles que me fizeram ver a beleza e a importância da Botânica em nossas vidas. Não posso deixar de agradecer também pelas coletas e pelos livros emprestados a mim nos últimos dois anos.

A professora Cleusa e ao Nilson, responsáveis pelo laboratório de Botânica Estrutural, por confiarem em mim e permitirem a utilização das dependências do laboratório em horários e dias não habituais, sempre me ajudando quando eu precisava.

A equipe técnica do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, do Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal

e da Coleção Entomológica Padre Jesus Santiago Moure pela disponibilidade, pela atenção, gentileza e pela confiança em mim depositada.

Ao Vinicius Trettel Rodrigues, ao Mauro Rosim e ao Sr. Masuji pela disponibilização de plantas essenciais para a realização deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a todos os meus colegas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho e que sempre se mostraram dispostos a ajudar. Enfim, muito obrigada a todos!

## RESUMO

*Acianthera* é formado por aproximadamente 291 espécies de plantas epífitas e litófitas, sendo bem representado no Brasil, onde ocorrem 125 espécies. Em 1986, *Acianthera* e *Pleurobotryum* passaram a ser considerados subgêneros de *Pleurothallis*. Estudos moleculares apontaram que *Pleurothallis* não era um grupo monofilético, e *Acianthera* passou a ser circunscrito novamente como gênero de Pleurothallidinae. Após recente revisão taxonômica baseada em dados moleculares, *Acianthera* foi subdividido em dez seções, dentre elas *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, que engloba as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pleurobotryum*. *Acianthera* seção *Pleurobotryae* é formada por quatro espécies: *A. atropurpurea*, *A. crepiniana*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana*. Seus representantes apresentam alto grau de diferenciação morfológica, podendo apresentar cauloma ereto, subereto ou pendente, folhas compressas lateralmente ou cilíndricas. Assim, estudos anatômicos dos representantes da seção podem facilitar a caracterização de seus membros, bem como colaborar na compreensão das relações filogenéticas do gênero. Amostras de raízes, ramicaules e folhas de 15 espécies, representantes de oito das dez seções de *Acianthera*, foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Os estudos anatômicos de órgãos vegetativos e micromorfológicos florais revelaram caracteres anatômicos sinapomórficos para os representantes de *A. seção Pleurobotryae*: a presença de folhas unifaciais circulares ou elípticas em secção transversal, folhas circulares com feixes vasculares organizados em círculos concêntricos e mesofilo formado por 28 a 30 camadas de células. Verificamos ainda que as folhas elípticas presentes em *A. crepiniana* surgiram a partir das folhas circulares presentes nas demais espécies de *A. seção Pleurobotryae*. Em *Acianthera* foram observados tricomas radiculares simples e espiralados que se originam na camada mais externa do velame e permanecem na raiz mesmo após o seu completo desenvolvimento. Estes tricomas radiculares atuam na adesão da planta ao substrato e na captação de água e nutrientes. A anatomia floral das espécies de *A. seção Pleurobotryae* e de outras espécies analisadas, indica que as pétalas reduzidas destas espécies apresentam um feixe vascular colateral, enquanto que as sépalas e o labelo apresentam três feixes vasculares. Em todos os representantes de *A. seção Pleurobotryae*, a base e o sulco central do labelo apresentaram células com características de nectários. As sépalas e o labelo de todas as espécies analisadas apresentaram células papilosas e tricomas que podem atuar na emissão de odores. As sépalas apresentam poros estomáticos que possivelmente atuam na liberação de odores e o labelo apresenta diferentes tipos de ornamentações na cutícula, além de poros e rupturas, por onde pode ocorrer a liberação de fragrâncias. A presença de tecidos produtores de néctar no labelo das espécies de *A. seção Pleurobotryae*, é uma característica floral compartilhada entre os representantes desta seção, pois as demais espécies analisadas não apresentaram esta característica. Assim, as espécies de *A. seção Pleurobotryae* podem atrair os polinizadores pela emissão de odores e recompensá-los produzindo néctar, enquanto que as demais espécies analisadas podem atrair os polinizadores pela emissão de odores e não oferecer recompensas florais.

Palavras-chave: Anatomia floral. Folhas unifaciais. Nectários. Osmóforos. *Pleurothallis*. *Pleurobotryum*. Tricomas radiculares.



## ABSTRACT

*Acianthera* is formed by approximately 291 species of epiphytic and lithophyte plants, in Brazil there are 125 species. In 1986 *Acianthera* and *Pleurobotryum* came to be considered subgenus of *Pleurothallis*, but molecular studies pointed out that *Pleurothallis* was not a monophyletic group and *Acianthera* was again circumscribed as a genus of Pleurothallidinae. After recent taxonomic revision based on molecular data, *Acianthera* was subdivided into ten sections, among them *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* that encompasses the species previously belonging to the genus *Pleurobotryum*. *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* is formed by four species: *A. atropurpurea*, *A. crepiniana*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana*. Its representatives present a high degree of morphological differentiation, being able to present erect, suberecto or pendent ramicaul, lateral or cylindrical compressive leaves. Thus, anatomical studies of the representatives of the section can facilitate the characterization of its members, as well as collaborate in the understanding of the phylogenetic relationships of the genus. Roots, ramicauls and leaves of 15 species representative of eight of the ten sections of *Acianthera* were analyzed in Scanning electron microscopy and light microscopy. The study of the vegetative anatomy and floral micromorphology revealed unique anatomical characters for the representatives of *A. sect. Pleurobotryae*: unifacial leaves, circular or elliptical leaves in cross-section, circular leaves with organized vascular bundles in concentric circles and mesophyll formed by 28 to 30 layers of cells. We also verified that the elliptic leaves present in *A. crepiniana* appeared from the circular leaves present in the other species of *A. sect. Pleurobotryae*. In *Acianthera*, simple and spiraled root trichomes originate in the outermost layer of the velamen and remain in the root even after their complete development. These root trichomes act in the adhesion of the plant to the substrate as well as the water and nutrient uptake. The floral anatomy of the species of *A. sect. Pleurobotryae* and other species analyzed indicates that the reduced petals of these species present a collateral vascular bundle, whereas the sepals and the lip have three vascular bundles. In all the representatives of the *A. sect. Pleurobotryae*, the base and the central groove of the lip had cells with nectary characteristics. The sepals and the lip of all the analyzed species presented papillary cells and trichomes that can act in the emission of odors. The sepals have stomatal pores that may act on the release of odors and the lip presents different types of ornaments in the cuticle, as well as pores and ruptures, where the release of fragrances may occur. The presence of nectar-producing tissues in the lip of *A. sect. Pleurobotryae* is a floral characteristic shared by representatives of this section, since the other species analyzed did not present this characteristic. Thus, the species of *A. sect. Pleurobotryae* can attract pollinators by the emission of odors and reward them producing nectar, While the other species analyzed can attract pollinators by the emission of odors and do not offer floral rewards.

Key-words: Floral anatomy. Nectaries. Osmophores. *Pleurobotryum*. *Pleurothallis*. Root hairs. Unifacial leaves.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>CAPITULO I - ANATOMIA COMPARADA DE <i>ACIANTHERA</i> SEÇÃO <i>PLEUROBOTRYAE</i> (ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE).....</b>	<b>19</b>
2.1	INTRODUÇÃO.....	19
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	21
2.3	RESULTADOS .....	23
2.4	DISCUSSÃO .....	28
2.5	REFERÊNCIAS .....	32
<b>3</b>	<b>CAPITULO II – DESENVOLVIMENTO E FUNÇÃO DOS TRICOMAS RADICULARES EM <i>ACIANTHERA</i> SCHEIDW. (ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE) .....</b>	<b>48</b>
3.1	INTRODUÇÃO.....	49
3.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	50
3.3	RESULTADOS .....	51
3.4	DISCUSSÃO .....	53
3.5	CONCLUSÃO .....	55
3.6	REFERÊNCIAS .....	55
<b>4</b>	<b>CAPITULO III - ANATOMIA FLORAL DE <i>ACIANTHERA</i> SEÇÃO <i>PLEUROBOTRYAE</i> (ORCHIDACEAE: PLEUROTHALLIDINAE).....</b>	<b>57</b>
4.1	INTRODUÇÃO.....	57
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	59
4.3	RESULTADOS .....	60
4.4	DISCUSSÃO .....	63
4.5	REFERÊNCIAS .....	66
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS FINAIS .....</b>	<b>76</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias de plantas vasculares, compreendendo aproximadamente 7% de todas as angiospermas (Chase, 2005). Seus representantes apresentam grande distribuição geográfica, sendo encontrados em quase todos os biomas, exceto em desertos verdadeiros (Stern, 2014). Os neotrópicos possuem grande riqueza e diversidade de orquídeas e aproximadamente 2.500 espécies ocorrem no território brasileiro (Barros et al. 2015). Revisões atuais apontam que Orchidaceae possui 25.000 espécies distribuídas em 736 gêneros e novos gêneros têm sido frequentemente descritos (Chase et al., 2015).

Análises moleculares recentes dividiram a família Orchidaceae em cinco subfamílias, dentre elas Epidendroideae Lindl. (Chase et al., 2003). Após a publicação desta classificação, notou-se um grande progresso na compreensão das relações filogenéticas de Epidendroideae, a maior subfamília de Orchidaceae (Chase et al., 2015), composta por 19.785 espécies de plantas terrestres, litófitas, ou epífitas, agrupadas em 650 gêneros (Dressler, 1993; Freudenstein & Chase 2015).

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. ExG.Don, pertence à tribo Epidendreae Lindl., e é uma das maiores subtribos de Orchidaceae. Estudos recentes apontam que Pleurothallidinae é formada por 5.100 espécies (Karremans, 2016) amplamente distribuídas nos neotrópicos e a maior riqueza de espécies é encontrada nas florestas úmidas da Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru e Brasil (Luer, 1986; Pridgeon, 1982; Pridgeon et al., 2005).

Dentre os representantes de Pleurothallidinae, está o gênero *Acianthera* Scheidw., que atualmente compreende 291 espécies (Karremans, 2016) distribuídas na América do Sul; destas, 125 ocorrem no Brasil e cerca de 107 são endêmicas do território brasileiro (Barros et al., 2015; Chiron et al., 2012). Em 1986, Luer publicou um trabalho propondo um novo sistema de classificação intragenérico para o gênero *Pleurothallis* R.Br.; na ocasião, ele se baseou nos caracteres morfológicos para reclassificar muitos gêneros, assim, *Acianthera* passou a ser tratado como subgênero de *Pleurothallis*. De acordo com Luer (1986), as características morfológicas diagnósticas para os representantes do subgênero *Acianthera* seriam a presença de caules reptantes ou cespitosos, ramicaules apresentando frequentemente restos de bainha foliar, sem ânulo e com uma única folha na parte

superior; inflorescências geralmente racemosas emergindo apicalmente ou lateralmente do ramicaule; sépalas carnudas geralmente pubescentes externamente, sépalas laterais com diferentes níveis de conação; pétalas normalmente reduzidas, curtas e variáveis; labelo lingulado articulado com a coluna; rostelo e estigma ventrais; pé da coluna curto e robusto e presença de duas políneas.

O gênero *Pleurobotryum* Barb. Rodr. foi criado em 1877 para alocar apenas uma espécie, *Pleurobotryum atropurpureum* Barb. Rodr., sendo inicialmente um gênero monoespecífico e após 1936, vários autores foram alocando outras espécies neste gênero (Hoehne, 1936, Garay, 1952; Pabst & Dungs, 1975). Com a nova classificação do gênero *Pleurothallis* proposta por Luer (1986), *Pleurobotryum* também foi circunscrito como subgênero de *Pleurothallis* composto por sete espécies: *Pleurobotryum albopurpureum* (Kraenzl.) Garay, *Pleurobotryum atropurpureum*, *Pleurobotryum crepinianum* (Cong.) Hoehne, *Pleurobotryum hatschbachii* (Schltr.) Hoehne, *Pleurobotryum mantiquyranum* (Barb. Rodr.) Hoehne, *Pleurobotryum rhabdosepalum* (Schltr.) Hoehne, *Pleurobotryum subulifolium* (Kraenzl.) Pabst. De acordo com Luer (1986), as características diagnósticas de *Acianthera* subgênero *Pleurobotryum* são rizomas reptantes; folhas teretes ou compressas maiores que o ramicaule; a inflorescência racemosa emergindo da base da folha; as sépalas laterais conadas até a região mediana; labelo espatulado, com lâmina angulada na base com um par de calos; coluna alongada com estigma ventral.

Após a realização de análises filogenéticas dos representantes de Pleurothallidinae com o auxílio de DNA nuclear e DNA plastidial, Pridgeon & Chase (2001) constataram que *Pleurothallis* não era um gênero monofilético e *Acianthera* passou a ser circunscrito novamente como gênero de Pleurothallidinae. Chiron & van den Berg (2012) realizaram uma revisão taxonômica de *Acianthera* baseada em análises moleculares da sequência ITS de DNA ribossômico. Com base nos resultados obtidos, estes autores criaram um novo sistema de classificação para *Acianthera*, que passou a ser subdividido em dez seções: *Acianthera* sec. *Acianthera*, A. sec. *Arthrosiae* Chiron & van den Berg, A. sec. *Crinitae* Chiron & van den Berg, A. sec. *Cryptophoranthae* (Luer) Chiron & van den Berg, A. sec. *Sarracenellae* Chiron & van den Berg, A. sec. *Sicariae* (Lindl.) Chiron & van den Berg, A. sec. *Sulcatae* Chiron & van den Berg, A. sec. *Tomentosae* (Luer) Chiron &

van den Berg, A. sec. *Tricarinatae* (Luer) Chiron & van den Berg e A. sec. *Pleurobotryae* Chiron & van den Berg que engloba as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pleurobotryum*. Dentro desta proposta, *Acianthera* seção *Pleurobotryae* passou a conter seis espécies: *Acianthera albopurpurea* (Kraenzl.) Chiron & van den Berg, *Acianthera atropurpurea* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg, *Acianthera hatschbachii* (Schltr.) Chiron & van den Berg, *Acianthera crepiniana* (Cong.) Chiron & van den Berg, *Acianthera rhabdosepala* (Schltr.) Chiron & van den Berg e *Acianthera subulifolia* (Krzl.) Chiron & van den Berg.

Ao realizar uma revisão taxonômica de *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, Rodrigues et al. (2015) constataram que das seis espécies consideradas integrantes dessa seção, apenas quatro podem ser claramente diferenciadas (Fig. 1): *Acianthera atropurpurea* (Barb. Rodr.) Chiron e van den Berg, *A. hatschbachii* (Schltr.) Chiron & van den Berg, *A. crepiniana* (Cogn.) Chiron & van den Berg e *A. mantiquyrana* (Barb. Rodr.) V.T. Rodrigues & F. Barros, sendo os demais nomes sinônimos de espécies já conhecidas. Além disso, constataram que *Acianthera rhabdosepala* (Schltr.) Chiron & van den Berg e *Acianthera subulifolia* (Krzl.) Chiron & van den Berg são sinônimos de *A. mantiquyrana*.

Chiron & van den Berg (2012) afirmaram que o labelo longamente unguiculado seria uma das características morfológicas mais marcantes dos representantes de A. seção *Pleurobotryae*. Rodrigues (2013), através das análises filogenéticas com marcadores ITS e matK, constatou que A. seção *Pleurobotryae* é um clado monofilético bem suportado (Fig. 2) e sugeriu que a característica diagnóstica para os representantes desta seção seria a combinação de folhas cilíndricas ou lateralmente compressas aliadas a um cauloma filiforme, uma vez que labelo longamente unguiculado está presente em espécies alocadas em outras seções após a análise de dados moleculares.

Em Pleurothallidinae os principais estudos anatômicos dos órgãos vegetativos foram realizados por Pridgeon & Williams (1979), Pridgeon (1981, 1982) e Benzing & Pridgeon (1983). Em *Acianthera* descrições anatômicas de órgãos vegetativos foram realizadas por Scatena & Nunes (1996), Oliveira & Sajo (1999) e Silva et al. (2010). Os representantes de *Acianthera* são predominantemente epífitos ou litófitos (Luer, 1986) e apresentam grande variedade morfológica, principalmente dos órgãos vegetativos (Fig. 3). Essa grande diversidade morfológica é observada mesmo entre representantes da mesma seção, como é o caso das espécies de *Acianthera* seção

*Pleurobotryae*, que apresentam cauloma ereto, subereto ou pendente, folhas lateralmente compressas ou cilíndricas. Neste sentido, Rodrigues et al. (no prelo) afirmam que um estudo de anatomia foliar de representantes de A. seção *Pleurobotryae* poderia facilitar a caracterização desta seção e colaborar na compreensão das relações filogenéticas do gênero.

As orquídeas podem atrair seus polinizadores através da emissão de odores e recompensá-los através da produção de néctar, óleos e compostos resinosos ou cerosos (Singer, 2003). Néctar é a principal recompensa oferecida pelas orquídeas aos seus polinizadores e em espécies de *Pleurothallis* pode ser produzido em nectários superficiais no labelo ou entre a coluna e o labelo (Dressler, 1993). A presença de nectários superficiais em outras espécies de Pleurothallidinae foi registrada por Borba & Semir (2001), Barbosa et al (2009), Duque-Buitrago et al. (2014). As características anatômicas e ultraestruturais de nectários e osmóforos em representantes de Pleurothallidinae foram descritas por Melo et al. (2010) e Cardoso (2014). Os nectários são os atrativos da maioria das flores de Orchidaceae e quando comparado ao número de espécies, os trabalhos anatômicos dessas estruturas são raros (Leitão et al. 2014).

Em *Acianthera*, as flores de espécies pertencentes à mesma seção podem apresentar características morfológicas diferentes, enquanto que espécies de seções diferentes podem apresentar caracteres florais semelhantes. Assim, estudos anatômicos florais em representantes de *Acianthera* podem esclarecer a ocorrência de estruturas secretoras compartilhadas entre as espécies do gênero e facilitar a interpretação da história evolutiva destas espécies.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: descrever a anatomia dos órgãos vegetativos e a micromorfologia floral de representantes de *Acianthera*; identificar caracteres anatômicos compartilhados exclusivamente entre os representantes de A. seção *Pleurobotryae*; verificar a evolução de caracteres anatômicos dentro de *Acianthera* seção *Pleurobotryae*; descrever o desenvolvimento e esclarecer a função dos tricomas radiculares presentes em *Acianthera*; descrever a anatomia floral das espécies de A. sec. *Pleurobotryae*.

Esta dissertação foi desenvolvida em três capítulos. O primeiro capítulo descreve os caracteres anatômicos apresentados pelos representantes de oito das dez seções de *Acianthera*. A proposta foi identificar sinapomorfias anatômicas para

os representantes de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* através da combinação dos dados anatômicos vegetativos, micromorfológicos florais e dados moleculares.

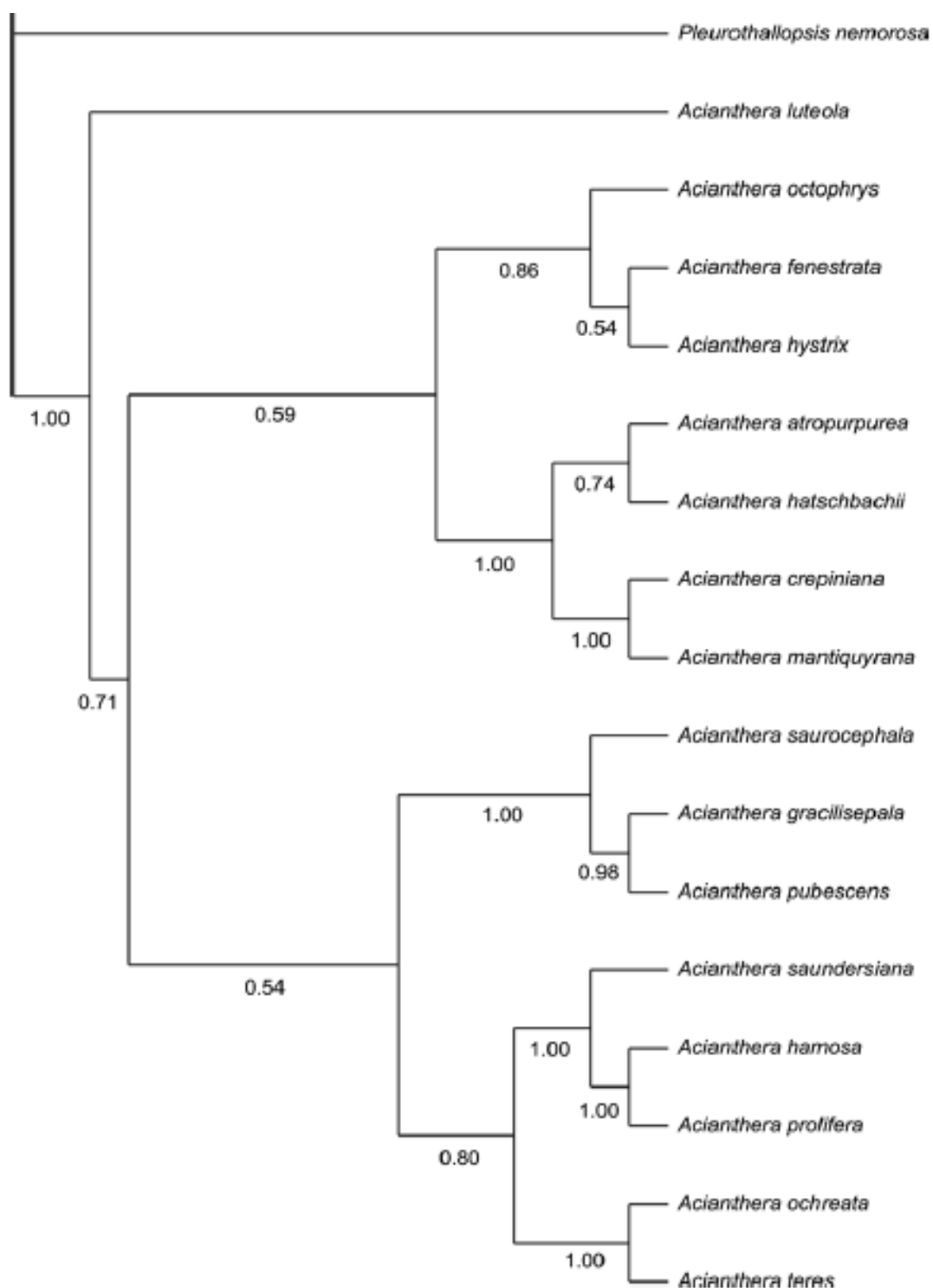
O segundo capítulo tratou do desenvolvimento e função dos tricomas radiculares observados em 13 espécies de *Acianthera*. Os tricomas radiculares são bem estudados do ponto de vista fisiológico e molecular em outras espécies de plantas vasculares, porém em Orchidaceae os registros destas estruturas são escassos e sua função não estava esclarecida.

O terceiro capítulo descreveu a anatomia floral das quatro espécies atualmente aceitas para *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, comparando-as com a anatomia floral apresentada por *A. gracilisepala* (*A.* seção *Acianthera*) e *A. octophrys* (*A.* seção *Tomentosae*). Poucos estudos sobre a anatomia floral de espécies de *Acianthera* foram desenvolvidos, porém estas informações podem ser úteis para interpretação da história evolutiva de seus representantes. Os capítulos foram formatados de acordo com as normas das revistas as quais foram/serão submetidos.



**Figura 1** – Aspectos morfológicos de *Acianthera* seção *Pleurobotryae*. **A** *Acianthera crepiniana* com folhas lateralmente compressas, no detalhe, labelo com margem denticulada. **B** *Acianthera hatschbachii* com folhas cilíndricas pendentes. **C** Flores de *Acianthera atropurpurea*. **D** *A. mantiquyrana* com folhas cilíndricas eretas. **E** Flores de *A. mantiquyrana*. Fotos: A: Luiz Filipe Varella; C: Dalton Holland Baptista; B, D, E: Francisney Vinhos. (Fonte: Rodrigues et al., 2015).





**Figura 2** - Árvore de consenso estrito da análise Bayesiana obtida da análise sequências das regiões matK do DNA de cloroplastos e ITS do DNA ribossômico nuclear. Os valores de probabilidade posterior estão indicados abaixo dos ramos. (Fonte: Rodrigues, 2013).



**Figura 3** – Diversidade morfológica dos representantes de *Acianthera*. **A** Inflorescências e folhas cilíndricas sulcadas de *A. teres*. **B** *A. prolifera* com folha semi plana e inflorescência. **C** Flor de *A. gracilisepala*. **D** Flor de *A. octophrys*. **E** Inflorescência de *A. pubescens*. **F** Folha semi plana e inflorescência de *A. luteola*. **G** Flores de *A. saurocephala*. Fotos: Eric de Camargo Smidt.

## REFERÊNCIAS

- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO L.; FURTADO S. G.; NARDY C.; AZEVEDO C. O.; GUIMARÃES L. R. S. Orchidaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2015 Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10986>> Acesso em 20/11/2016.
- BARBOSA, R. A.; MELO, M. C.; BORBA, E. L. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. **Plant Systematic and Evolution** 283(1-2): 1-8, 2009.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. **Annals of Botany** 88(1): 75-88, 2001.

- BORBA, E. L.; SHEPHERD, G. J.; VAN DEN BERG, C.; SEMIR, J. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: Correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. **Annals of Botany** 90: 219-230, 2002.
- BENZING, D. H.; PRIDGEON, A. M. Foliar trichomes of *Pleurothallidinae* (Orchidaceae): functional significance. **American Journal of Botany**, 70(2): 173-180, 1983.
- CARDOSO, P. R. **Desenvolvimento floral em espécies de *Pleurothallidinae* (Orchidaceae) com ênfase nas estruturas secretoras**. 212 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, São Paulo, 2014.
- CHASE, M. W.; FREUDENSTEIN, J. V.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.; KELL, S. P.; BARRETT, R. L and CRIBB, P. J. (Eds). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications, p. 69-89, 2003.
- CHASE, M. W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. **Curti's Botanical Magazine**. 22(1): 2-7, 2005.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An update classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2015, 177, 151-174, 2015.
- CHIRON, G. R.; GUIARD, J.; VAN DEN BERG, C. Phylogenetics relationships in Brazilian *Pleurothallis sensulato* (*Pleurothallidinae*, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. **Phytotaxa** 46: 34-58, 2012.
- CHIRON, G. R.; VAN DEN BERG, C. Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidacea, *Pleurothallidinae*). **Richardiana** 12: 59-77, 2012.
- DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland: **Dioscorides**, 314 p. 1993.
- DUQUE-BUITRAGO, C. A.; ALZATE-QUINTERO, N. F.; OTERO, T. Nocturnal pollination by Fungus gnats of the Colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: *Pleurothallidinae*). **Lankesteriana** 13(3): 407-417, 2014.
- GARAY, L. A. Notatio Orchidologica II. **Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** 12: 169-186, 1952.
- HOEHNE, F. C. Orchidaceas dos Herbarios de Alexandre Curt Brade e do Museu Nacional. **Boletim do Museu Nacional** 12: 1-37, 1936.
- KARREMANS, A. P. Genera *Pleurothallidarum*: an updated phylogenetic overview of *Pleurothallidinae*. **Lankesteriana** 16(2): 219-241, 2016.
- LEITÃO, C. A. E.; DOLDER, M. A. H.; CORTELAZZO, A. L. Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). **Flora** 209: 233-243, 2014.
- LUER, C. A. Icones *Pleurothallidarum* III. **Systematics of *Pleurothallis* (Orchidaceae)**. **Monographs in Systematic Botany** v. 20. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, 1986.
- MELO, M. C.; BORBA, E. L.; PAIVA, E. A. S. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: *Pleurothallidinae*). **Plant Systematic and Evolution** 286(3-4): 141-151, 2010.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses** v.1. Kurt Schmersow, Hildesheim, 1975.

- PRIDGEON, A. M.; WILLIAMS, N. H. Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). **Selbyana**, 5(2): 120-134, 1979.
- PRIDGEON, A. M. Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. 68(1): 64-71, 1981.
- PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 69(6): 981 – 938, 1982.
- PRIDGEON, A. M. & CHASE, M. W. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Lindleyana** 16: 235-271, 2001.
- PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**, v. 4. Oxford University Press, New York, 2005.
- RODRIGUES, V. T. **Sinopse, filogenia e citotaxonomia de *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg (Orchidaceae)**. 84f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e meio ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.
- RODRIGUES, V. T.; SMIDT, E. C.; BARROS, F. Revisão taxonômica de *Acianthera* sec. *Pleurobotryae* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). **Hoehnea** 42(4): 615-627, 2015.
- RODRIGUES, V. T.; SMIDT, E. C.; BOLSON, M.; BARROS, F. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Botany**. No prelo.
- SINGER, R. B. Orchid pollination: recent developments from Brazil. **Lankesteriana**, 7: 111-114, 2003.

## **CAPÍTULO I - Anatomia comparada de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**

(A ser submetido à Plant Systematics and Evolution)

### **RESUMO**

Após a constatação do polifiletismo de *Pleurothallis*, *Acianthera* voltou a ser tratado como gênero de Pleurothallidinae, passando a ser subdividido em dez seções, dentre elas *A.* seção *Pleurobotryae*, que engloba as espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pleurobotryum*. Em recente revisão taxonômica, foram reconhecidas como integrantes de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* quatro espécies, que apresentam alto grau de diferenciação morfológica. Neste sentido, estudos anatômicos podem facilitar a caracterização da seção e estabelecer uma possível relação entre as espécies através do levantamento de caracteres compartilhados. Raízes, ramicaules e lâminas foliares de 15 espécies representando oito das dez seções do gênero, incluindo todas as espécies de *A.* seção *Pleurobotryae*, foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz. Após a realização de análises cladísticas com os dados anatômicos vegetativos combinados aos dados micromorfológicos florais e moleculares, foi possível constatar que a presença de folhas unifaciais, as folhas circulares ou elípticas em secção transversal, as folhas circulares com feixes vasculares organizados em círculos concêntricos e o mesofilo formado por 28 a 30 camadas de células são os caracteres anatômicos compartilhados exclusivamente entre os representantes de *A.* seção *Pleurobotryae*. Além disso, as análises cladísticas mostraram que as folhas elípticas de *A. crepiniana* são derivadas das folhas circulares presentes nas demais espécies da seção. Os caracteres vegetativos apresentaram menor índice de homoplasias, confirmando que estes são mais conservativos que os caracteres micromorfológicos florais e podem ser úteis para inferir relações filogenéticas em níveis internos de *Acianthera*.

**Palavras-chave:** Evolução de caracteres · Micromorfologia floral · Neotrópico · *Pleurobotryum* · *Pleurobotryae* · Sistemática

### **2.1 Introdução**

Orchidaceae Juss. compreende aproximadamente 7% de todas as angiospermas, sendo formada por 25.000 espécies e 736 gêneros (Chase et al.

2015). A família está dividida em cinco subfamílias, dentre elas Epidendroideae Lindl., que é a maior subfamília de Orchidaceae (Chase et al. 2015) composta por 19.785 espécies e 650 gêneros, distribuídos em 15 tribos e 26 subtribos (Freudenstein & Chase 2015). Os representantes de Epidendroideae são plantas terrestres, litófitas, e principalmente epífitas (Dressler 1993; Pridgeon et al. 2005).

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. Ex G.Don (Epidendreae Lindl., Epidendroideae) é uma das maiores de Orchidaceae, formada por 5.100 espécies, o equivalente a 20% de todas as espécies de orquídeas conhecidas (Karremans 2016). Os representantes de Pleurothallidinae possuem distribuição neotropical e a maior riqueza de espécies está localizada nas florestas úmidas da Costa Rica, Panamá, Colômbia, Equador, Venezuela, Peru e Brasil (Pridgeon 1982; Luer 1986; Pridgeon et al. 2005).

Baseado em caracteres morfológicos, Luer (1986) propôs um sistema de classificação intragenérico para o gênero *Pleurothallis* R.Br., alterando a circunscrição de muitos gêneros de Pleurothallidinae, dentre eles *Acianthera* Scheidw., que passou a ser tratado como subgênero de *Pleurothallis*. Após a realização de análises filogenéticas com o auxílio de DNA nuclear e DNA plastidial, Pridgeon & Chase (2001) constataram que *Pleurothallis* não era um grupo monofilético, reclassificando *Acianthera* como gênero de Pleurothallidinae. Atualmente *Acianthera* compreende 291 espécies (Karremans, 2016) distribuídas na América do Sul, sendo o segundo maior gênero de Pleurothallidinae no Brasil (Chiron et al. 2012), onde ocorrem 125 espécies, destas 104 são endêmicas do território brasileiro (Barros et al. 2015).

Após a revisão taxonômica baseada em análises moleculares, *Acianthera* passou a ser subdividido em dez seções dentre elas A. seção *Pleurobotryae* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg (Chiron & van den Berg 2012). *Acianthera* seção *Pleurobotryae* é composta por quatro espécies claramente diferenciadas: *Acianthera atropurpurea* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg, *A. hatschbachii* (Schltr.) Chiron & van den Berg, *A. crepiniana* (Cogn.) Chiron & van den Berg e *A. mantiquyrana* (Barb. Rodr.) V.T. Rodrigues & F. Barros (Rodrigues et al. 2015). Seus representantes possuem flores com labelo longamente unguiculado e por meio de análises filogenéticas com marcadores ITS e matK, Rodrigues et al. (no prelo), constataram que A. seção *Pleurobotryae* é um grupo monofilético com alto suporte e sugeriram que a característica diagnóstica para os representantes desta seção seria a

combinação de folhas cilíndricas ou lateralmente compressas aliadas a um cauloma filiforme, uma vez que labelo unguiculado está presente em *A. octophrys* Rchb. f. que pelos resultados das análises moleculares faz parte de *Acianthera* seção *Tomentosae* Luer.

Em Pleurothallidinae, os principais estudos anatômicos foram realizados por Pridgeon & Williams (1979); Pridgeon (1981, 1982) e Benzing & Pridgeon (1983). Descrições anatômicas dos órgãos vegetativos de representantes de *Acianthera* foram realizados por Scatena & Nunes (1996), Oliveira & Sajo (1999) e Silva et al. (2010). Em *Acianthera* tanto a morfologia vegetativa quanto a morfologia floral são muito variáveis, dependendo do grupo particular a ser examinado (Chiron et al. 2012) e seus representantes apresentam grande variedade morfológica, principalmente no que se refere aos órgãos vegetativos.

Como existe uma grande variação morfológica entre as espécies de *Acianthera*, estudos anatômicos podem facilitar a caracterização das seções, bem como colaborar na compreensão das relações filogenéticas dentro do gênero. Neste contexto, o presente capítulo tem por objetivos: descrever a anatomia dos órgãos vegetativos e a micromorfologia floral de representantes de *Acianthera*; identificar caracteres anatômicos compartilhados exclusivamente entre os representantes de *A.* seção *Pleurobotryae* e inferir relações filogenéticas baseadas em dados anatômicos combinados aos dados moleculares, a fim de verificar a evolução dos caracteres anatômicos dentro de *Acianthera* seção *Pleurobotryae*.

## 2.2 Material e Métodos

**Espécies estudadas** - Foram analisadas 15 espécies de *Acianthera* englobando oito das 10 seções do gênero (Tabela 1). O grupo externo foi representado pela espécie *Pleurothallopsis nemorosa* Porto & Brade.

**Microscopia de luz** - Para as análises em microscopia de luz, amostras de raízes, ramicaules e o terço médio da lâmina foliar foram fixadas em FAA 50 (Johansen 1940). O material foi seccionado à mão livre com o auxílio de lâmina de barbear, corado com azul de alcian 8GX e fucsina básica (Luque et al. 1996) e montado em gelatina glicerizada (Kaiser 1880). Amostras de raízes foram processadas em Leica Historesin® de acordo com as instruções do fabricante e coradas com azul de toluidina (O' Brien et al. 1964). Foram realizados testes histoquímicos com lugol (Johansen 1940) para a detecção de amido, floroglucinol



acidificado (Foster 1949) para a detecção de lignina e Sudam III (Sass 1951) para a detecção de lipídeos. Amostras de lâminas foliares foram submetidas ao processo de maceração (Franklin 1945) e coradas em safranina alcoólica 50% (Berlyn and Miksche 1976).

A autofluorescência dos espessamentos de parede presentes nos idioblastos traqueoidais foi registrada através de análises em microscopia de fluorescência (Liu et al. 1994), para isso utilizou-se filtro RFP ou Texas red no microscópio Olympus BX51 acoplado com câmera fotográfica Olympus DP72. Amostras foram observadas no microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan) e para a visualização das imagens utilizou-se o programa Imaging Software NisElements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan).

O padrão de deposição de cera epicuticular está de acordo com a terminologia proposta por Barthlott et al. (1998). A classificação da espessura das paredes celulares seguiu o modelo proposto pelo IAWA Committee (1989). As papilas foram classificadas de acordo com Stern (2004).

**Microscopia Eletrônica de Varredura** - Amostras de raízes, folhas e flores previamente fixadas foram desidratadas em série etílica, submetidas ao ponto crítico e metalizadas com ouro. O registro eletromicrográfico foi realizado com o microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU.

**Análises Cladísticas** – A matriz de caracteres foi construída com o auxílio do programa Mesquite 3.1 (Maddison & Maddison 2016) e a codificação destes caracteres seguiu Sereno (2007). Os caracteres quantitativos foram codificados de acordo com Thiele (1991). Todos os caracteres foram tratados de forma a apresentar o mesmo peso e estados desordenados (Fitch 1971). Os dados moleculares das regiões nuclear (nrITS) e plastidial (cpDNAMatK) foram disponibilizados por Rodrigues et al. (No prelo).

As análises de máxima parcimônia foram realizadas com PAUP 4.0b10a (Swofford 2003). As análises incluíram 1.000 repetições de adição de táxon aleatórias, contendo 10 árvores por repetição com algoritmo TBR, seguido de uma segunda pesquisa para explorar todas as topologias da pesquisa anterior, limitada a 10.000 árvores. O suporte foi estimado por 1.000 repetições de bootstrap (Felsenstein 1985) com adição simples do algoritmo TBR, contendo 10 árvores por repetição utilizando o programa PAUP.

As relações entre as espécies também foram avaliadas sob análise bayesiana por meio do programa MrBayes 3.1 (Ronquist et al. 2005). Os modelos evolutivos utilizados nos dados moleculares seguem Rodrigues et al. (no prelo), sendo ITS1(K80+G), 5.8S(K80) e ITS2(HKY+G) para nrITS e GTR+G para matK. Para os dados morfológicos o modelo utilizado foi mk1 (Lewis 2001). Empregou-se cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) iniciadas a partir de árvores aleatórias executando dez milhões de gerações, com amostragem de árvores a cada 1000 gerações. Foram descartadas 25% das gerações iniciais como período de “burn-in”, após inspeção visual da estabilização da probabilidade logarítmica das árvores, tal como medido pelo Stdev (s) e os valores de PSRF (Gelman & Rubin 1992). As árvores resultantes foram usadas para produzir uma árvore de consenso de maioria com probabilidade posterior dos clados e visualizada com Tree View (Page 1996).

A árvore consenso estrito gerada pela análise de máxima parcimônia da matriz de evidência total foi utilizada para a reconstrução de estados ancestrais com o auxílio do programa Mesquite 3.1 (Maddison & Maddison 2016) e Winclada (Nixon 2002).

## 2.3 Resultados

**Raiz** – Todas as espécies analisadas apresentaram velame biestratificado (Fig. 1A). Nos representantes de A. seção *Pleurobotryae*, a exoderme apresenta espessamento de parede em “U” invertido (Figs. 1B, 1C) e o córtex é parenquimatoso, formado por 8 a 10 camadas de células (Fig. 1B), as demais espécies apresentaram variação tanto no número de camadas corticais quanto no tipo de espessamento das células exodérmicas. Dentre as espécies de A. seção *Pleurobotryae*, apenas *A. hatschbachii* não possui ráfides na região cortical. A endoderme das espécies de A. seção *Pleurobotryae* e da maioria das espécies analisadas, apresentou espessamento de parede em “O” (Figs. 1D), exceto *A. mantiquyrana*, *A. luteola* (Lindl.) Pridgeon & Chase e *A. octophrys* cujo espessamento de parede endodérmica é em “U” (Fig. 1E). *Acianthera atropurpurea* e *A. mantiquyrana* apresentaram células endodérmicas com paredes muito finas (Fig. 1E), enquanto paredes finas a espessas foram observadas na endoderme de *A. crepiniana* e *A. hatschbachii* (Fig. 1D), as demais espécies apresentaram células endodérmicas com espessura de parede variável. As células de passagem ocorrem em grupos de uma, duas ou três células nas espécies analisadas (Figs. 1D, 1E). O

número de pólos de protoxilema é variável entre as espécies, entre os representantes de *A. seção Pleurobotryae*, *A. mantiquyrana* apresentou até sete polos (Fig. 1E), *A. hatschbachii* nove pólos, *A. atropurpurea* e *A. crepiniana* mais de nove pólos (Fig. 1D). Idioblastos com espessamento de parede reticulado ocorrem no córtex e na região medular de *A. hatschbachii* e nas demais espécies de outras seções analisadas. (Fig. 1F).

**Ramicaule** - Em secção transversal, o ramicaule é circular nas espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 2A), as demais espécies possuem ramicaule circular, circular sulcado (Fig. 2B) ou triangular (Fig. 2C). A região cortical é formada por sete a 10 camadas de células nos representantes de *A. seção Pleurobotryae*, nas demais espécies este número é variável, podendo chegar a 16 camadas. Em *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana* o córtex externo é formado por três camadas de células esclerificadas, em *A. crepiniana* é formado por cinco camadas (Fig. 2D), nas demais espécies o número de camadas esclerificadas é variável e apenas *A. hystrix* não apresentou esta característica (Fig. 2E). Aerênquima e grãos de amido estão presentes na região cortical das espécies de *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 2D), com exceção de *A. mantiquyrana*, que não apresentou aerênquima, e *A. hatschbachii*, que não apresentou grãos de amido nesta região. O sistema vascular é formado por feixes vasculares colaterais organizados em círculos concêntricos (Fig. 2A-2C). O número de feixes vasculares é variável entre as espécies analisadas. O tecido fundamental interfascicular é formado por células esclerificadas em todos os representantes de *A. seção Pleurobotryae* e nas demais espécies analisadas, exceto em *A. hystrix*. A região medular é constituída por células de paredes lignificadas, apenas *A. hystrix* e *A. pubescens* (Lindl.) Pridgeon & Chase apresentaram região medular formada por células cujas paredes não apresentam lignificação (Fig. 2F).

**Folha** – Em secção transversal, as folhas de *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana* são circulares (Fig. 3A), de *A. crepiniana* são elípticas (Fig. 3B) e das demais espécies são circulares sulcadas (Fig. 3C), planas (Fig. 3D) ou semi planas (Fig. 3E). Os representantes de *A. seção Pleurobotryae* apresentam folhas unifacias (Fig. 3A, 3B), nas demais espécies as folhas são bifaciais hipostomáticas, com exceção de *A. prolifera* e *A. teres* que possuem folhas bifaciais anfistomáticas. As espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* apresentam feixes vasculares organizados em círculos concêntricos (Fig. 3A) ou em duas fileiras paralelas ao

maior eixo da folha (Fig. 3B), as demais espécies apresentam variações na organização dos feixes vasculares. Nas espécies analisadas a epiderme é lisa (Fig. 4A), verrucosa (Fig. 4B) ou papilosa (Fig. 4C). Dentre as espécies de *A. seção Pleurobotryae*, *A. atropurpurea* e *A. hatschbachii* apresentaram epiderme lisa, *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* apresentaram epiderme papilosa. O complexo estomático é formado por até cinco células subsidiárias nos representantes de *A. seção Pleurobotryae* e em *A. fenestrata* (Barb. Rodr.) Pridgeon & Chase, *A. luteola* e *A. pubescens* (Fig. 4D), nas demais espécies o complexo estomático é formado por seis células subsidiárias (Fig. 4E). Cicatrizes de tricomas foram observadas na epiderme das espécies analisadas (Fig. 4D, seta), exceto em *A. luteola* e *Pleurothallopsis nemorosa*. Em secção transversal a epiderme é poligonal (Fig. 4F), em forma de domo (Fig. 4G) ou papilosa (Fig. 4H). Dentre as espécies analisadas, apenas *A. crepiniana* não apresentou hipoderme claramente diferenciada (Fig. 4H), nas demais espécies a hipoderme é uniestratificada (Fig. 4F). Parênquima clorofiliano homogêneo foi registrado em todas as espécies analisadas, exceto em *P. nemorosa* cujo parênquima clorofiliano é heterogêneo (Fig. 4I). As espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* apresentaram mesofilo formado por 28 a 36 camadas de células, com parênquima aquífero disperso pelo mesofilo (Fig. 4J), as demais espécies apresentaram número de camadas no mesofilo e organização do parênquima aquífero variáveis. Idioblastos traqueoidais cilíndricos e/ou globosos com espessamento helicoidal lignificado estão presentes no parênquima aquífero (Fig. 4K), exceto em *P. nemorosa* e nos representantes de *A. seção Pleurobotryae*.

**Sépalas** – As flores dos representantes de *A. seção Pleurobotryae* e da maioria das espécies analisadas, apresentaram sépalas dorsais livres das sépalas laterais (Figs. 5B-5E), exceto *A. atropurpurea* (Fig. 5A), *A. fenestrata*, *A. hystrix*, *A. prolifera* (Herbex Lindl.) Pridgeon & Chase (Fig. 5F), *A. ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & Chase e *A. teres* (Lindl.) Borba (Fig. 5G) que apresentaram sépalas parcialmente coalescentes. As sépalas dorsais apresentaram bordo inteiro ou delimitado, glabro, ciliado ou papiloso (Figs. 6A-6D), esta característica apresentou-se variável mesmo entre os representantes de *A. seção Pleurobotryae*. Diferentes níveis de coalescência nas sépalas laterais foram observados entre as espécies de *A. seção Pleurobotryae* e nas demais espécies analisadas (Fig. 6E-6G). A presença de mento foi registrada nas sépalas laterais de *A. luteola*, *A. octophrys*, *A. fenestrata*, *A. saundersiana* (Rchb.f.) Pridgeon & Chase, *A. prolifera*, *A. ochreatea* e *A. teres* (Fig.

6G). Em vista frontal, a epiderme é formada por células oblongas e isodiamétricas. Estômatos estão presentes nas sépalas de todas as espécies analisadas (Fig. 6H). A distribuição dos estômatos é variável mesmo entre os representantes de *A. seção Pleurobotryae*, onde ocorrem sépalas anfiestomáticas, hipoestomáticas e epiestomáticas. Células apicais com formato diferenciado em relação às demais foram registradas nas sépalas de grande parte das espécies estudadas, exceto em *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii*, *A. hystrix*, *A. luteola*, *A. mantiquyrana* e *A. octophrys*. Nas espécies de *A. seção Pleurobotryae* e em *A. ochreatea* as sépalas são papilosas (Fig. 6A, 6C, 6D), em *A. luteola* as sépalas são glabras, as demais espécies possuem papilas e tricomas na superfície epidérmica (Fig. 6H). As espécies de *A. seção Pleurobotryae* apresentaram papilas simples, papilas cônicas (Fig. 6D) e papilas com ápice aciculado (Fig. 6I), as demais espécies apresentaram também papilas ovadas (Fig. 6J), obovadas (Fig. 6A, 6J) e papilas obpiriformes na epiderme (Fig. 6K).

**Labelo** – Nos representantes de *A. seção Pleurobotryae*, o labelo é inteiro (Fig. 7A), com exceção de *A. crepiniana* que apresenta labelo trilobado como nas demais espécies analisadas (Figs. 7B, 7C, 7D). Os lobos laterais são arredondados (Fig. 7B), exceto em *A. crepiniana*, *A. gracilisepala* (Brade) Luer, *A. pubescens*, *A. prolifera*, *A. saundersiana* e *A. teres* que possuem lobos laterais apiculados (Fig. 7C). Todas as espécies de *A. seção Pleurobotryae* apresentaram labelo com ápice arredondado e bordo serreado (Fig. 7A), nas demais espécies o ápice possui formato variável e o bordo é inteiro, serreado ou ciliado (Figs. 7B-7D). A superfície é homogênea em *A. pubescens*, *A. saundersiana* e nas espécies de *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 7A), exceto em *A. atropurpurea* (Fig. 7H). Em vista frontal, as células podem ser oblongas (Fig. 7E), isodiamétricas ou poligonais (Figs. 7F, 7G). O labelo das espécies de *A. seção Pleurobotryae* é papiloso formado por papilas simples e papilas imbricadas (Fig. 7H), as demais espécies apresentam papilas cônicas, papilas ovadas (Fig. 7G), papilas obpiriformes (Fig. 7I) e tricomas de diferentes tipos na superfície epidérmica (Figs. 7J, 7K). Com exceção de *A. mantiquyrana*, a cutícula das espécies analisadas é ornamentada, podendo apresentar estrias longitudinais, retículos (Fig. 7H), estrias transversais (Fig. 7E), estrias concêntricas (Fig. 7F) e estrias irregulares (Fig. 7I, 7J).

**Pétalas**– As pétalas são reduzidas em todas as espécies analisadas. Nas espécies de *A. seção Pleurobotryae* as pétalas são oblanceoladas com bordo inteiro,

exceto em *A. mantiquyrana* que apresenta pétalas lineares com bordo serrado (Fig. 8A), as demais espécies apresentaram pétalas oblanceoladas (Fig. 8B) e deltóides (Fig. 8C) com bordo inteiro ou serrado. Pétalas com regiões papilosas foram observadas em *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii*, *A. pubescens*, *A. prolifera*, *A. ochreatea* e *A. teres* (Fig. 8D), as demais espécies possuem pétalas glabras (Fig. 8E).

**Coluna** – O clinândrio é denticulado em grande parte das espécies de *A. seção Pleurobotryae* e nas demais espécies analisadas (Fig. 8F), com exceção de *A. crepiniana*, *P. nemorosa*, *A. octophrys* e *A. hystrix* que apresentam clinândrio liso (Fig. 8G). A coluna é glabra (Fig. 8H), exceto em *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii* e *A. pubescens*, *A. ochreatea*, *A. saurocephala* (Lodd.) Pridgeon & Chase e *A. teres* que apresentaram regiões papilosas na coluna (Fig. 8I). A cutícula é ornamentada em todas as espécies estudadas (Figs. 8H, 8I).

**Análises Cladísticas** – Foram identificados 68 caracteres anatômicos, sendo 40 binários e 28 multiestados, utilizados na construção da matriz morfológica (Tabelas 2 e 3) e 1512 caracteres moleculares utilizados para construir a matriz molecular. As matrizes de dados anatômicos vegetativos, florais, e moleculares foram analisadas separadas e combinadas (tabela 4).

Na matriz de evidência total (dados anatômicos e dados moleculares) a busca heurística reteve uma árvore mais parcimoniosa com 584 passos de comprimento, índice de consistência (CI) = 0.64, índice de retenção (IR) = 0.48 e índice de homoplasia de 0.35. Dos 1580 caracteres analisados, 1273 são constantes e 148 (11%) são parcimoniosamente informativos.

As análises de Máxima Parcimônia e Bayesiana (Figs. 9, 10) indicam que *A. seção Pleurobotryae* é um grupo monofilético altamente suportado (valor de bootstrap BP = 100 / probabilidade posterior PP = 1.00) (Figs. 9, 10). As espécies de *A. seção Pleurobotryae* podem ser reconhecidas pelas seguintes sinapomorfias morfológicas: presença de folhas elípticas e circulares (caracter C= 20, estados E= 2,3), presença de folhas unifaciais (C= 21, E= 1), folhas com feixes organizados em círculos concêntricos (C= 23, E= 1) e mesofilo formado por de 28 a 30 camadas de células (C= 35, E= 3) (Fig. 11). A presença de córtex externo formado por 3 camadas (C= 13, E= 1), a ausência de idioblastos traqueoidais no mesofilo (C= 38, E= 0) e labelo com ápice arredondado (C= 54, E= 0) são as homoplasias que em conjunto caracterizam os representantes de *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 11).

As quatro espécies de *A.* seção *Pleurobotryae* formam dois clados (Figs. 9,10), na análise bayesiana o clado formado por *A. atropurpurea* e *A. hatschbachii* aparece fortemente suportado (PP = 0.94) (Fig. 10), porém na análise de máxima parcimônia ele aparece com suporte de bootstrap fraco (Fig. 9), sendo caracterizado pelo conjunto das seguintes homoplasias: córtex formado por oito a nove camadas de células (C= 14, E= 1), sépala dorsal com bordo inteiro (C= 43, E= 1) e pelas células epidérmicas papilosas na coluna (C= 67, E= 1) (Fig. 11). O clado formado por *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* apresenta alto suporte nos dois tipos de análises cladísticas (BP = 93 / PP = 1.00), sendo a presença de folhas com epiderme papilosa (C= 24, E= 2) sépalas laterais coalescentes em mais de dois terços do comprimento (C=4 5, E= 1) são as homoplasias que em conjunto caracterizam este clado (Fig. 11).

*Acianthera gracilisepala* apareceu como espécie irmã do clado formado por *A. saurocephala* e *A. pubescens* com suporte de bootstrap moderado, mas alto valor de probabilidade posterior (BP= 84 / PP= 0.99) (Figs. 9, 10). Este clado é caracterizado pela ausência de idioblastos com ráfides no mesofilo (apomorfia morfológica, caracter 41, estado 0) e pela presença de sépala dorsal com bordo delimitado (homoplasia morfológica, C= 43, E= 1).

O clado formado por *A. saundersiana* e *A. prolifera* apresenta alto suporte nos dois tipos de análises (BP = 99 / PP = 1.00) e a presença de três camadas corticais esclerificadas no ramicaule (C= 13, E= 1) é a homoplasia morfológica compartilhada entre as espécies do clado. *Acianthera teres* e *A. ochreatea* formam o clado irmão de *A. saundersiana* e *A. prolifera* apresentando alto suporte (BP = 100 / PP = 1.00), sendo que a presença de 26 a 28 feixes vasculares no ramicaule (C= 18, E= 2), folhas com feixes vasculares organizados em uma fileira (C= 23, E= 0), mesofilo formado por de 25 a 26 camadas (C= 35, E= 2) e coluna com células papilosas (C=67, E= 1) representam o conjunto de homoplasias que caracterizam este clado. A apomorfia compartilhada entre os representantes do clado é a presença de células epidérmicas papilosas nas pétalas (C= 65, E= 1).

## 2.4 Discussão

No presente estudo, foram encontrados caracteres anatômicos, que em conjunto, representam caracteres sinapomórficos das quatro espécies pertencentes à *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, como folhas unifaciais circulares ou elípticas em



secção transversal, folhas circulares com feixes vasculares organizados em círculos concêntricos, mesofilo formado por 28 a 30 camadas de células, além de caracteres homoplásicos que em conjunto são exclusivos dos representantes da seção, como a presença de três camadas corticais esclerificadas no ramicaule, a ausência de idioblastos traqueoidais no mesofilo e labelo com ápice arredondado. Os caracteres vegetativos apresentaram menor índice de homoplasias, confirmando que estes são mais conservativos que os caracteres micromorfológicos florais e podem ser úteis para inferir relações filogenéticas em níveis internos de *Acianthera*.

As espécies pertencentes à *A. seção Pleurobotryae* são plantas epífitas, ocorrendo em regiões serranas na Floresta Atlântica, entre 500 a 2.000 m de altitude e apresentam folhas cilíndricas ou lateralmente compressas (Rodrigues et al, 2015). Em secção transversal, a presença de folhas circulares em *A. mantiquyrana*, *A. hatschbachii* e *A. atropurpurea* é um caráter sinapomórfico para estas espécies; as folhas elípticas apresentadas por *A. crepiniana* aparecem como autapomorfia para esta espécie e a reconstrução de estados ancestrais, mostra que as folhas elípticas de *A. crepiniana* surgiram a partir das folhas circulares presentes nas outras espécies de *A. seção Pleurobotryae*.

A presença de folhas unifaciais e de folhas circulares com feixes vasculares organizados em círculos também são caracteres sinapomórficos dos representantes de *A. seção Pleurobotryae*. A anatomia das folhas teretes e lateralmente compressas das espécies que formam esta seção indicam a presença de folhas unifaciais, uma vez que estas apresentaram apenas a epiderme abaxial com estômatos em toda a sua extensão e os feixes vasculares estão posicionados em pares opostos ou em círculos, com xilema voltado para a face interna da lâmina foliar (Metcalf 1979). Folhas unifaciais com estas características anatômicas foram observadas em outros representantes de Epidendroideae por Stern et al. (1994). Apesar de serem cilíndricas, as folhas de *A. teres* são bifaciais ou dorsiventrais assim como as folhas das demais espécies analisadas, apresentando os feixes vasculares posicionados em fileiras com floema voltado para a região abaxial.

Uma das homoplasias que caracterizam as espécies de *A. seção Pleurobotryae* é a presença de três camadas corticais esclerificadas no ramicaule da maior parte das espécies da seção, com exceção de *A. crepiniana* que apresentou como caracter apomórfico a presença de cinco camadas. Nas demais espécies analisadas, o ramicaule apresenta córtex externo esclerificado com número de

camadas variáveis, exceto em *A. hystrix* que apresentou uma possível perda desta característica. A presença de córtex externo esclerificado foi registrada em algumas espécies de *Pleurothallis* por Pridgeon (1982) e em outras espécies de *Pleurothallidinae* por Stern et al. (1985) e, como os órgãos vegetativos dos representantes de *Pleurothallidinae* são delgados, o abundante esclerênquima presente na região cortical confere resistência a estas estruturas (Stern et al. 1985).

No presente estudo, idioblastos traqueoidais com espessamento helicoidal foram registrados no mesofilo das espécies analisadas, exceto em *P. nemorosa* (grupo externo) e nos representantes de *A. seção Pleurobotryae*, em que a ausência destas estruturas representa uma homoplasia compartilhada entre os representantes desta seção. Os elementos traqueoidais ou idioblastos traqueoidais como designados por Foster (1956) são células que diferem das demais em forma, tamanho, conteúdo ou estrutura de parede, sendo registrados com frequência em *Orchidaceae* (Olantui & Neguin 1980; Scatena & Nunes 1996; Stern 2014). Acredita-se que a função destas estruturas esteja relacionada ao suporte mecânico dos tecidos parenquimatosos que a circundam, uma vez que a parede com espessamento secundário previne o colapso durante o período de dessecação (Olantui & Neguin 1980). Existem divergências na literatura em relação ao principal componente químico do espessamento de parede dos idioblastos traqueoidais, Pridgeon (1982) não registrou a presença de lignina nos idioblastos e acredita que a parede celular destes espessamentos seja exclusivamente celulósica, porém Olantui & Neguin (1980) e Scatena & Nunes (1996) afirmam que a parede espessada destas células apresenta lignina. Após a análise destas estruturas em microscopia de fluorescência (Liu et al. 1994), registramos a autofluorescência nos espessamentos de parede dos idioblastos, indicando a deposição de lignina nas paredes helicoidais apresentadas por estas estruturas. Assim, podemos afirmar que a lignina é o principal componente dos espessamentos de parede presentes nos idioblastos traqueoidais das folhas de representantes de *Acianthera* analisados neste trabalho.

Dentro de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* a presença de epiderme foliar papilosa é uma homoplasia compartilhada entre as espécies do clado formado por *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana*, esta característica anatômica foi registrada também em *Dresslerella* (Pridgeon & Williams 1979). A ausência de hipoderme é uma apomorfia de *A. crepiniana*, uma vez que as demais espécies apresentaram esta

característica, assim como outros representantes de *Pleurothallidinae* (Pridgeon, 1982).

*Acianthera hatschbachii* apresenta como apomorfia a presença de sépalas epiestomáticas e a localização dos estômatos nas sépalas mostrou-se variável mesmo entre as demais espécies de *A. seção Pleurobotryae*. A presença de poros estomáticos nas sépalas de espécies de *Acianthera* está relacionada à emissão de compostos voláteis pelos osmóforos (Melo et al. 2010), que são tecidos florais especializados para síntese e secreção de fragrâncias (Pridgeon & Stern 1985).

Em representantes de *Acianthera* as pétalas são reduzidas (Luer 1986), nas espécies analisadas foram observadas pétalas com formato variável, e a presença de pétalas lineares é uma apomorfia de *A. mantiquyrana*. A presença de sépalas dorsais com bordo inteiro, e de células papilosas na coluna, são caracteres florais homoplásticos que caracterizam o clado de *A. seção Pleurobotryae* formado por *A. atropurpurea* e *A. hatschbachii*. As flores de algumas espécies de *Orchidaceae* podem apresentar diferentes tipos de papilas em várias regiões, inclusive na coluna e estas podem desempenhar diferentes papéis como produção de recompensas florais e proteção (Davies & Turner, 2004) ou ainda atuar na atração de polinizadores funcionando como osmóforos (Stern et al 1987).

A presença de labelo com ápice arredondado é uma das homoplasias exclusivas de *A. seção Pleurobotryae*. As características morfológicas do labelo compartilhadas entre diferentes espécies podem ser um indicativo de convergência em resposta a pressões por polinizadores semelhantes (Davies & Stpiczynska 2006) e as similaridades entre as flores de *Pleurothallis (Acianthera)* podem ocorrer devido o processo de convergência, uma vez que as espécies podem compartilhar o mesmo polinizador (Borba & Semir 2001). Assim, de acordo com Borba & Semir (2001), os caracteres florais podem não ser indicadores confiáveis para estabelecer as relações filogenéticas entre as espécies do grupo. Em representantes de *Pleurothallis*, os caracteres vegetativos podem trazer mais informações sobre as relações filogenéticas dessas espécies do que os caracteres florais, uma vez que estes podem sofrer mudanças em função do processo de polinização (Borba et al. 2002).

Neste estudo, o índice de homoplasias dos caracteres vegetativos foi 0.4, enquanto o índice de homoplasias dos caracteres florais foi de 0.6. Assim, confirmamos que os caracteres vegetativos são mais conservativos dentro das

espécies analisadas e podem propiciar mais informações sobre as relações filogenéticas de *A. seção Pleurobotryae*. Portanto, dentre as espécies analisadas neste trabalho observamos que as características anatômicas vegetativas mostraram-se mais conservativas que os caracteres florais. Estudos anatômicos e morfológicos com mais espécies do gênero poderiam facilitar a identificação dos caracteres anatômicos diagnósticos para cada seção, bem como a interpretação da história evolutiva dos caracteres anatômicos em representantes do gênero.

Assim, constatamos que *A. seção Pleurobotryae* é um clado monofilético fortemente suportado nas análises cladísticas dos dados anatômicos e micromorfológicos combinados aos dados moleculares, identificamos os caracteres anatômicos compartilhados exclusivamente pelos representantes desta seção e constatamos que as folhas elípticas de *A. crepiniana* surgiram a partir das folhas circulares presentes nos demais representantes de *A. seção Pleurobotryae*.

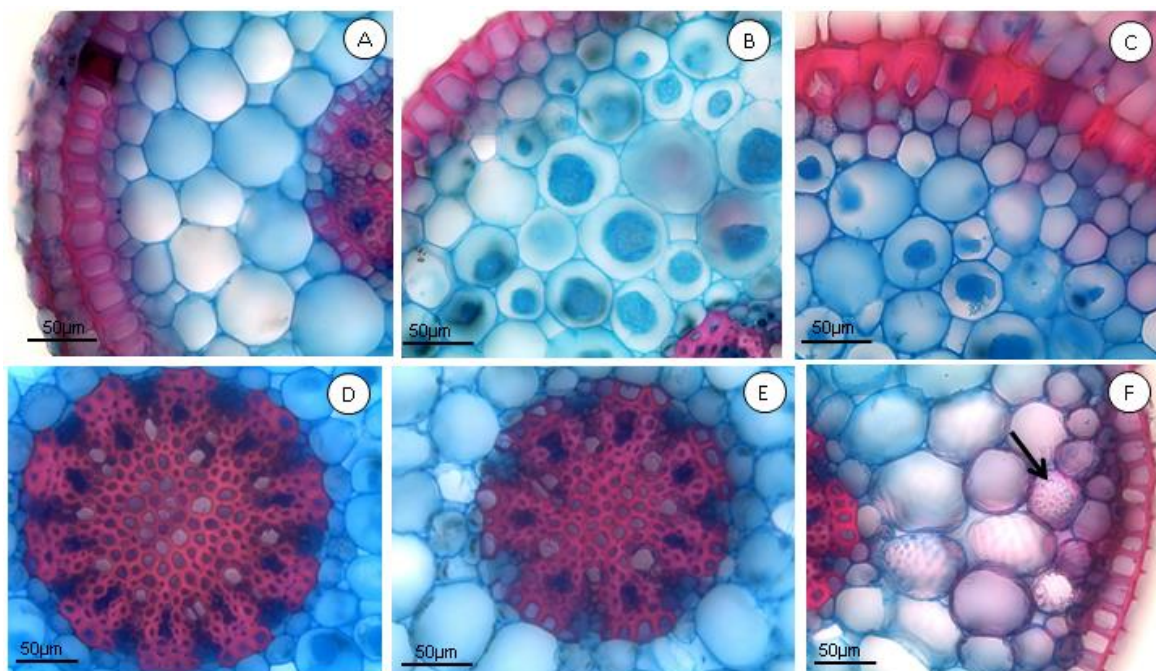
## 2.5 Referências

- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO, Guimarães LRS (2015) Orchidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10986>>
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. *Botanical Journal of the Linnean Society* 126(3): 237-260
- Benzing DH, Pridgeon AM (1983) Foliar trichomes of Pleurothallidinae (Orchidaceae): functional significance. *American Journal of Botany*, 70(2): 173-180.
- Borba EL, Shepherd GJ, van den Berg C, Semir J (2002) Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: Correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. *Annals of Botany* 90(2): 219-230
- Borba EL, Semir J (2001) Pollinator specificity and convergence in Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: A multiple population approach. *Annals of Botany* 88(1): 75 – 88. doi:10.1006/anbo.2001.1434
- Chase MW, Camerom KM, Freudenstein JV, Pridgeon AM, Salazar G, Van den Berg C, Schuitman A (2015) An update classification of Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 177(2): 151-174
- Chiron GR, Guiard J, Van den Berg C (2012) Phylogenetics relationships in Brazilian *Pleurothallis sensulato* (Pleurothallidinae, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. *Phytotaxa* 46(1): 34-58
- Chiron GR, van den Berg C (2012) Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidacea, Pleurothallidinae). *Richardiana* 12(2): 59-77

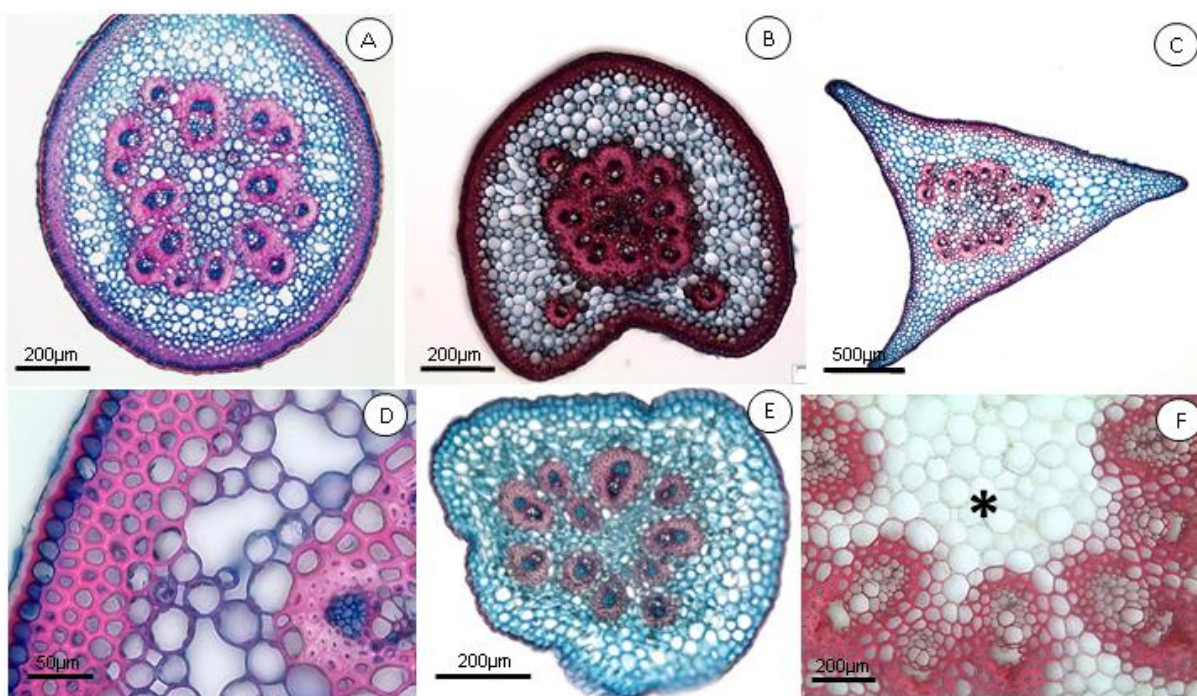
- Davies LK, Turner MP (2004) Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 93(1): 75–86. doi:10.1093/aob/mch007
- Davies LK, Stpiczyn'ska M. (2006) Labellar micromorphology of Bifrenariinae Dressler (Orchidaceae). *Annals of Botany* 98(6): 1215–1231. doi:10.1093/aob/mcl204
- Dressler RL (1993) *Phylogeny and classification of the orchid family*. Cambridge University Press
- Franklin GL (1945) Preparation of thin sections of sintetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. *Nature* 155(3924), 51
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. *Systematic Biology* 34(2): 152-161
- Freudenstein JV, Chase MW (2015) Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. *Annals of Botany* 115(4): 665-681
- Foster AS (1949) *Practical plant anatomy*. D. van Nostrand Company Inc., Princeton.
- Foster AS (1956) Plant idioblasts: remarkable examples of cell specializations. *Protoplasma* 46(1):184-193
- Fitch WM (1971) Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology* 20(4): 406-416
- Gelman A, Rubin DB (1992) Inference from iterative simulation using multiple sequences. *Statistical Science* 7: 457–72
- IAWA Committee (1989) International Association of Wood Anatomists. List of microscopic features for hardwood identification. *IAWA Bulletin* 10(3): 219-332
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. New York: McGraw Hill Book
- Kaiser E (1880) Verfahren zur Hestellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. *BotanischZentralb* 180: 25-26
- Karremans AP (2016) Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana* 16(2): 219-241
- Liu L, Dean JFD, Friedman WE, Eriksson KEL (1994) A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *The Plant Journal* 6 (2): 213-224
- Luer CA (1986) *Icones Pleurothallidinarum III. Systematics of Pleurothallis* (Orchidaceae). *Monographs in Systematic Botany*, v. 20. Missouri Botanical Garden, Saint Louis
- Luque RL, Sousa HC, Kraus JE (1996) Métodos de coloração de Roeser (1972)-modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de Alcão 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica* 10(2): 199-212
- Maddison WP, Maddison DR (2016) *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis*. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS (2010) Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematic and Evolution* 286(3-4): 141-151
- Metcalfe CR (1979) The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: Metcalfe CR, Chalk L (eds) *Anatomy of the dicotyledons I*, Clarendon Press: Oxford
- Nixon KC (2002) WinClada ver. 1.00. 08. Published by the author, Ithaca, NY.
- O'Brien TP, Feder N, Mccully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59(2): 368-373

- Olantui OA, Nenguim RO (1980) Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80(4): 357-370
- Oliveira VDC, Sajo MDG (1999) Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, 22(3), 365-374.
- Page RDM (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358
- Pridgeon AM, Williams NH (1979) Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). *Selbyana*, 5(2): 120-134
- Pridgeon AM (1981) Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 68(1): 64-71
- Pridgeon AM (1982) Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 69(6): 981-938
- Pridgeon AM, Stern WL (1985) Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette*, 146(1): 115-123
- Pridgeon AM, Chase MW (2001) A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16(4): 235-271
- Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. (eds.) (2005) *Genera Orchidacearum*, v. 4. Oxford University Press, New York
- Rodrigues VT, Smidt EC, Bolson M, Barros F. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Botany*. No prelo.
- Rodrigues VT, Smidt EC, Barros F (2015) Revisão taxonômica de *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Hoehnea* 42(4): 615-627
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, van den Mark P (2005) Mr Bayes 3.1. Manual. Available from: <http://mr bayes.net>
- Scatena VL, Nunes AC (1996) Anatomia de *Pleurothallis rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 15: 35-43
- Sereno PC (2007) Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23(6): 565–587
- Swofford DL (2003) {PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods). Version 4.}.
- Stern WT 2004. *Botanical latin*. Timber Press, Portland. 546p.
- Stern WL, Pridgeon AM, Luer CA (1985) Stem structure and its bearing on the systematics of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91(4): 457-471
- Stern WL, Curry KJ, Pridgeon AM (1987) Osmophores of *Stanhopea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 74(9): 1323-1331
- Stern WL, Morris MW, Judd WS (1994) Anatomy of the thick leaves in *Dendrobium* section *Rhizobium* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences* 155(6): 716-729
- Stern WL (2014) *Anatomy of the Monocotyledons Volume X: Orchidaceae*. Oxford University Press, Oxford
- Thiele K (1991) The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics* 9(3): 275-304



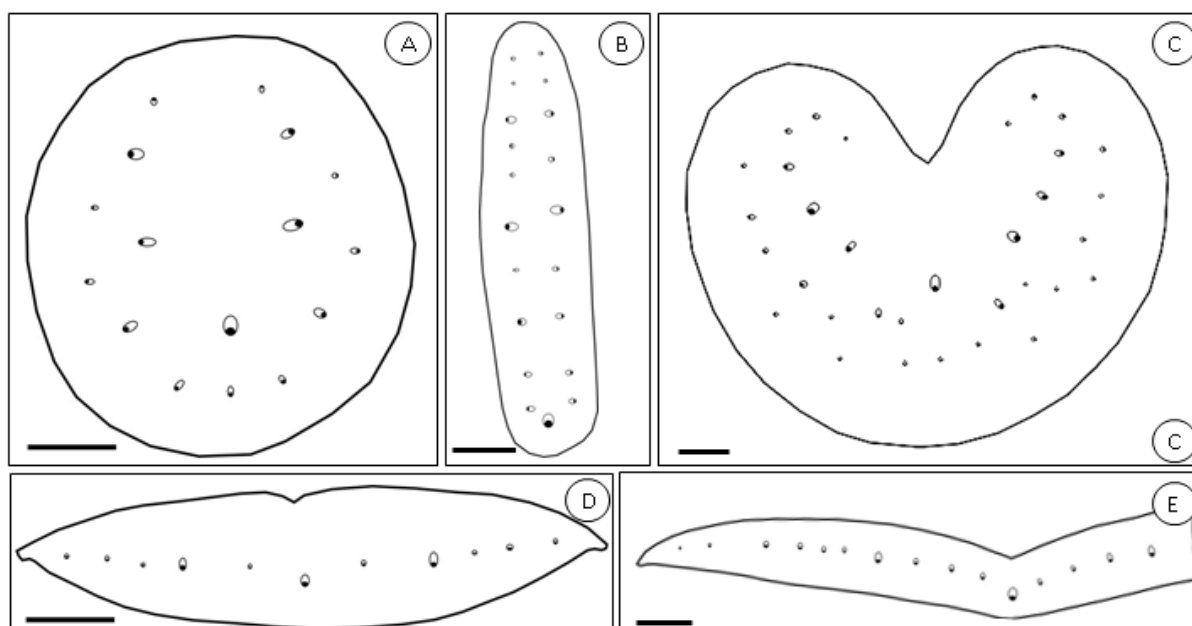


**Fig. 1** Aspectos anatômicos da raiz de *Acianthera*. **A** Raiz de *A. luteola* com velame biestratificado e exoderme em “O”. **B** Região cortical de *A. hatschbachii* com oito camadas de células. **C** Exoderme em “U” invertido de *A. crepiniana*. **D** Endoderme de *A. crepiniana* com células com espessamento de parede em “O” e cilindro vascular com 10 pólos de protoxilema. **E** Células endodérmicas de *A. mantiquyrana* com espessamento de paredes em “U” e cilindro vascular com sete pólos de protoxilema. **F** Região cortical de *A. fenestrata* com idioblastos reticulados (seta).

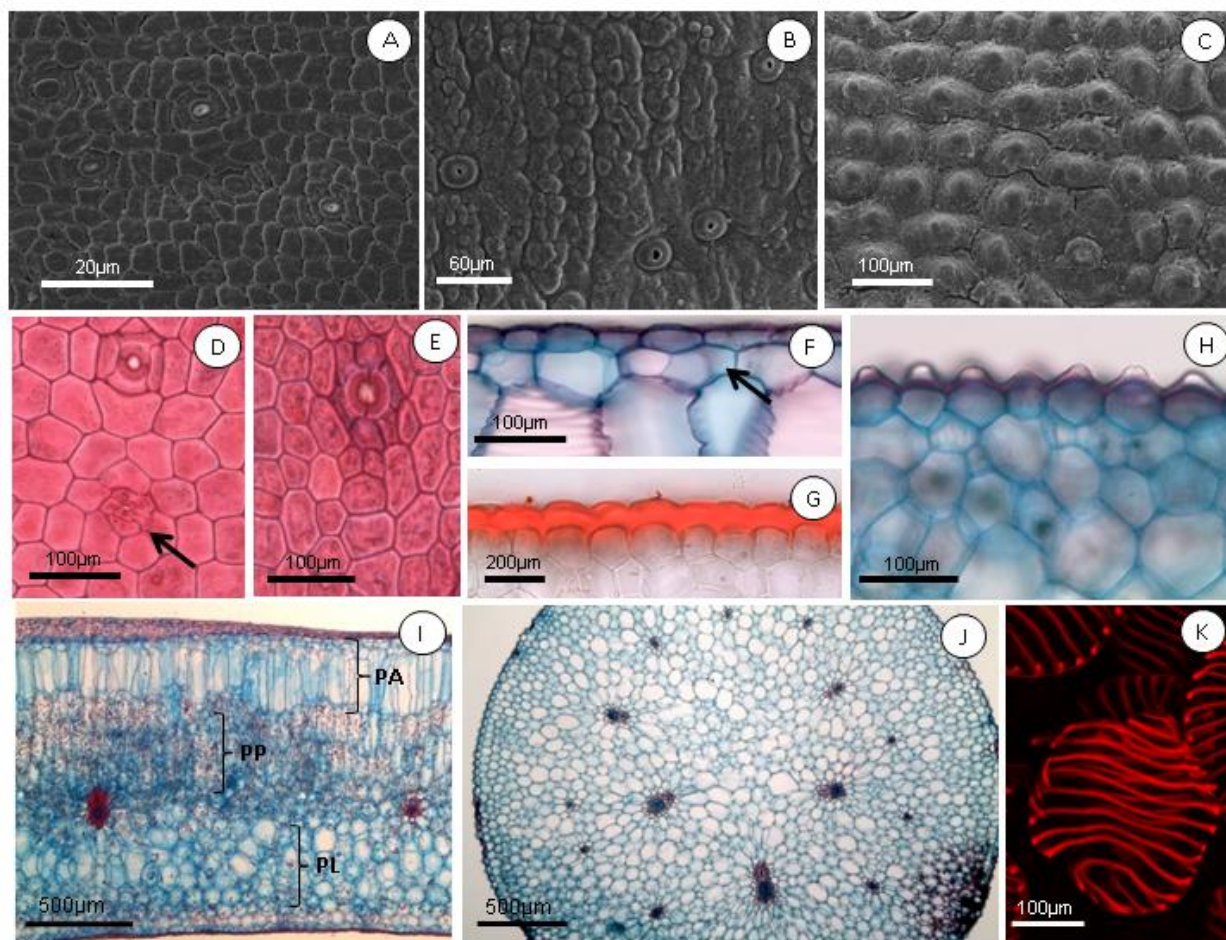


**Fig. 2** Aspectos anatômicos do ramicaule de *Acianthera* em secção transversal. **A** Ramicaule circular de *Acianthera crepiniana*. **B** Ramicaule circular sulcado de *A. saundersiana*. **C** Ramicaule triangular de *A. luteola*. **D** Córtex externo de *A. crepiniana* com cinco camadas de células esclerificadas. **E** Ramicaule de *A. hystrix* com córtex externo parenquimatoso. **F** Ramicaule de *A. pubescens* após a aplicação de floroglucinol acidificado evidenciando a região medular formada por células de paredes não lignificadas (asterisco).





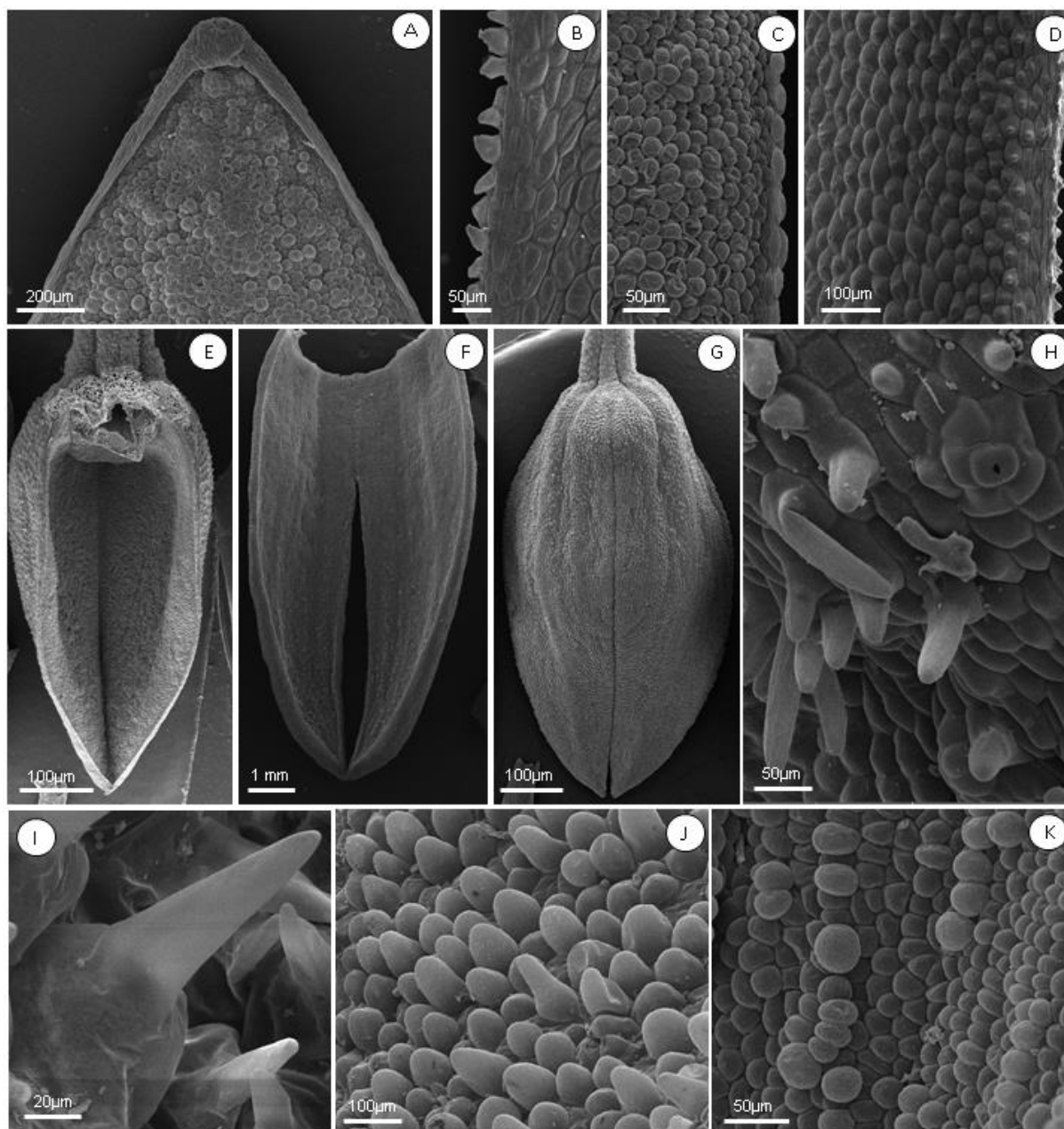
**Fig. 3.** Desenho esquemático do formato do limbo foliar de *Acianthera* em secção transversal. As regiões escuras nos feixes vasculares indicam a localização do floema. **A** Folha circular de *A. mantiquyrana* com feixes vasculares organizados em círculos concêntricos e feixes de maior calibre localizados na região central. **B** Folha elíptica de *A. crepiniana*, com feixes vasculares organizados em duas fileiras paralelas e feixe vascular de maior calibre localizado em uma das extremidades. **C** Folha circular sulcada de *A. teres* com feixes vasculares maiores mais próximos da face adaxial. **D** Folha plana de *A. hystrix*. **E** Folha semi plana de *A. saundersiana*. Barra= 1mm.



**Fig. 4** Aspectos anatômicos das folhas de *Acianthera* vistas em MEV (A - C), seções paradérmicas (D, E) e transversais (F - K) vistas em microscopia de luz (K). **A** Epiderme lisa de *A. saurocephala*. **B** Epiderme verrucosa de *A. luteola*. **C** Epiderme papilosa de *A. crepiniana*. **D** Vista frontal da epiderme de *A. atropurpurea* evidenciando as cicatrizes de inserção dos tricomas (seta). **E** Epiderme de *A. teres* com complexo estomático formado por seis células subsidiárias. **F** Células poligonais na epiderme de *A. saundersiana* evidenciando a hipoderme adaxial unisseriada (seta). **G** Células em forma de domo (dome-shaped) presentes na epiderme de *A. teres* observadas após a aplicação de Sudan III. **H** Epiderme papilosa de *A. crepiniana*. **I** Lâmina foliar de *Pleurothallopsis nemorosa* evidenciando o parênquima aquífero (PA) e mesófilo heterogêneo com parênquima paliádico (PP) e parênquima lacunoso (PL). **J** Mesófilo de *A. mantiquyrana*. **K** Idioblasto traqueoidal globoso presentes no mesófilo de *A. prolifera*.

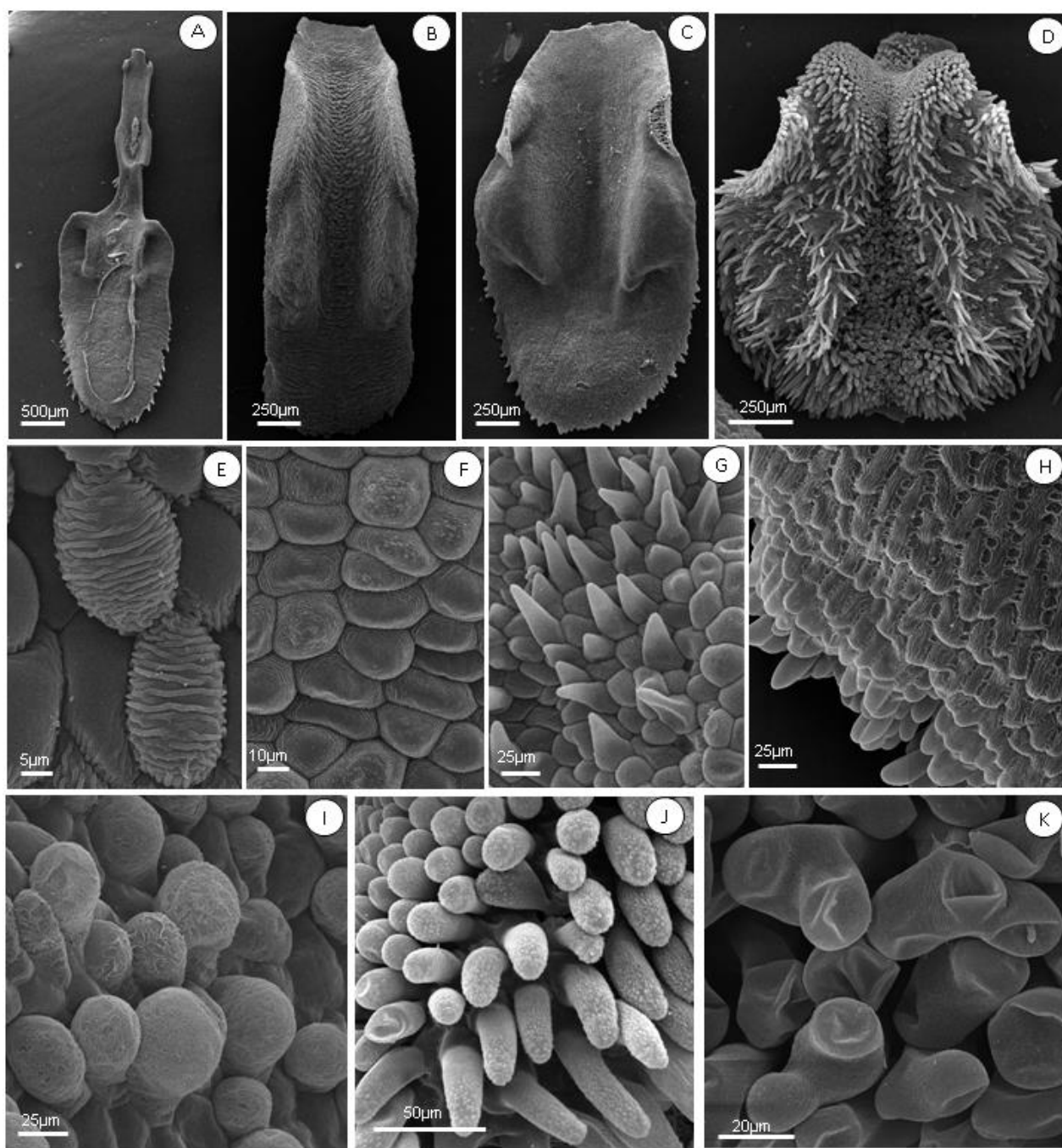


**Fig 5.** Aspectos gerais das flores de *Acianthera*. **A-D** espécies pertencentes à *Acianthera* seção *Pleurobotryae*. **A** *A. atropurpurea*. **B** *A. crepiniana*. **C** *A. hatschbachii*. **D** *A. mantiquyrana*. **E** *A. luteola*. **F** *A. prolifera*. **G** *A. teres*.

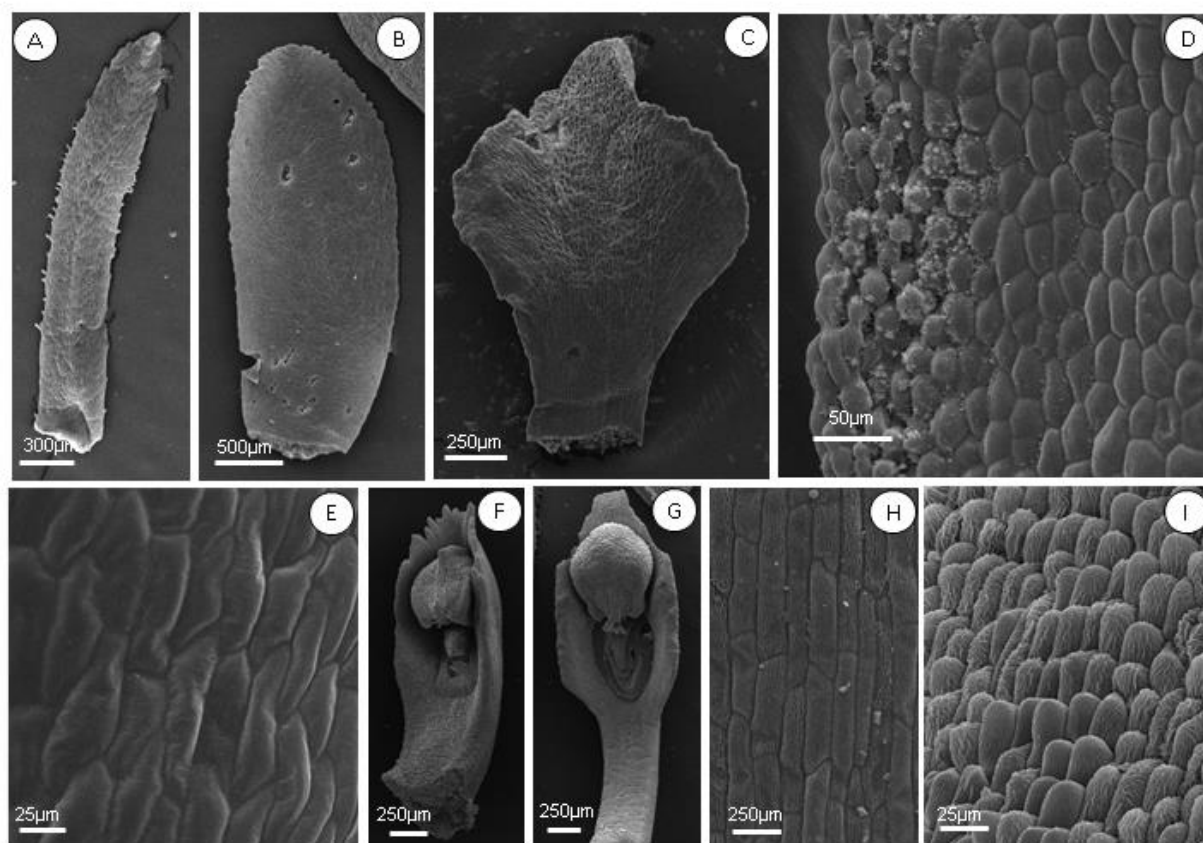


**Fig. 6** Micromorfologia das sépalas de *Acianthera*. **A** *A. prolifera* com papilas obovadas e estômatos no ápice. **B** Bordo inteiro ciliado de *A. crepiniana*. **C** bordo inteiro papiloso de *A. saundersiana*. **D** bordo delimitado papiloso de *A. atropurpurea*. **E - G** Sépalas laterais. **E** *A. fenestrata*. **F** *P. nemorosa*. **G** *A. saundersiana*. **H** Estômato, tricomas, papilas cônicas e papilas simples em *A. octophrys*. **I** papilas com ápice aciculado de *A. atropurpurea*. **J** papilas obovadas e papilas obpiriformes de *A. fenestrata*. **K** papilas simples e papilas obpiriformes de *P. nemorosa*.

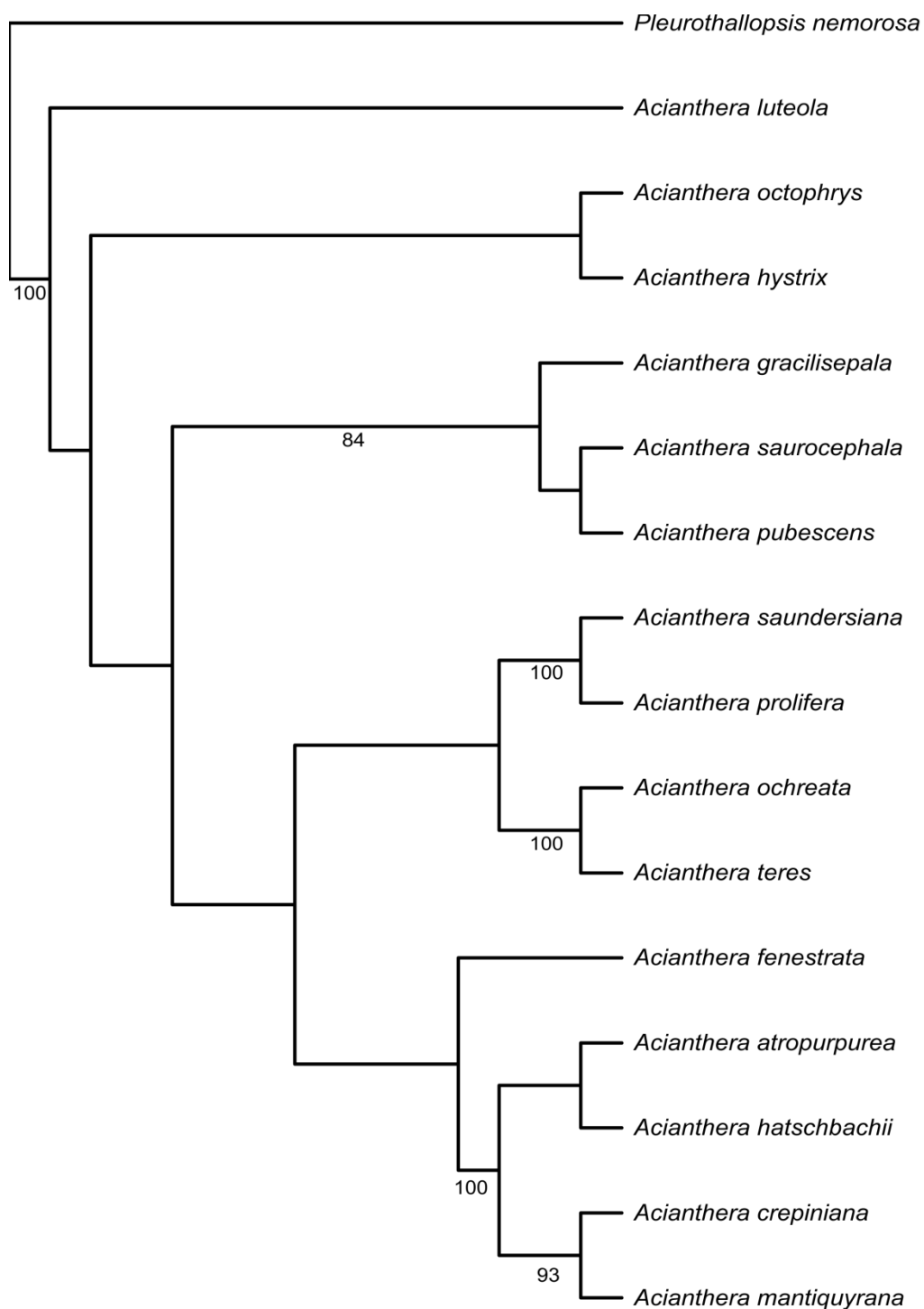




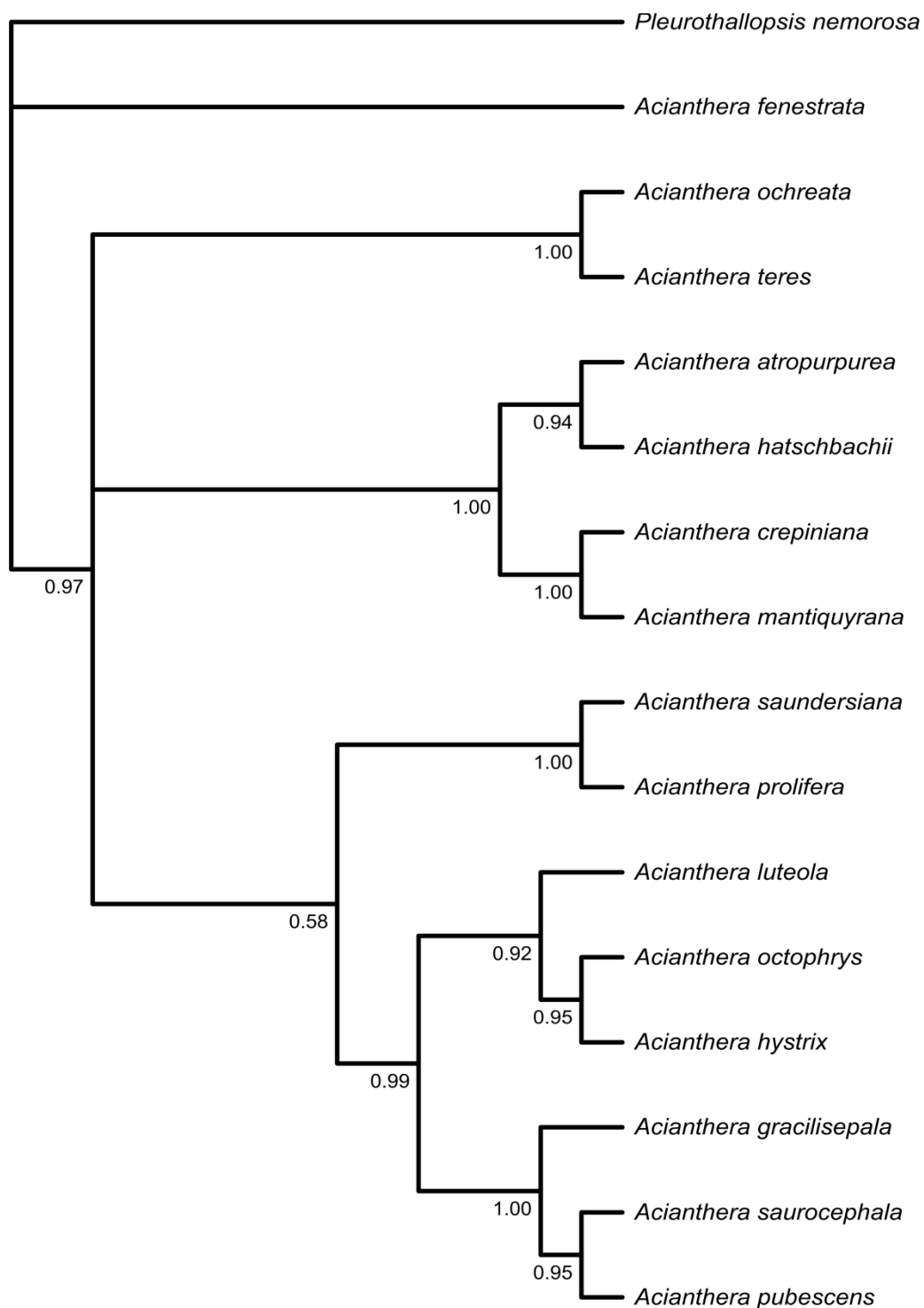
**Fig. 7** Visão geral e micromorfologia do labelo de *Acianthera*. **A** *A. hatschbachii*. **B** *A. ochreatea*. **C** *A. gracilisejala*. **D** *A. octophrys*. **E** células oblongas com estrias transversais de *A. octophrys*. **F** Células poligonais de *A. octophrys* com estrias concêntricas. **G** papilas simples, papilas cônicas e papilas ovadas de *P. nemorosa*. **H** papilas imbricadas de *A. atropurpurea*. **I** papilas obpiriformes de *A. saundersiana*. **J** tricomas simples de *A. octophrys*. **K** tricomas bifurcados de *A. octophrys*.



**Fig. 8** Micromorfologia das pétalas e coluna de *Acianthera*. **A** *A. saurocephala*. **B** *A. mantiqyrana*. **C** *P. nemorosa*. **D** papilas nas pétalas de *A. atropurpurea*. **E** pétala glabra de *A. teres*. **G** visão geral da coluna de *A. ochreatea*. **F** visão geral da coluna de *A. octophrys*. **H** células oblongas com parede reta na coluna de *A. fenestrata*. **I** papilas cônicas na coluna de *A. ochreatea*.

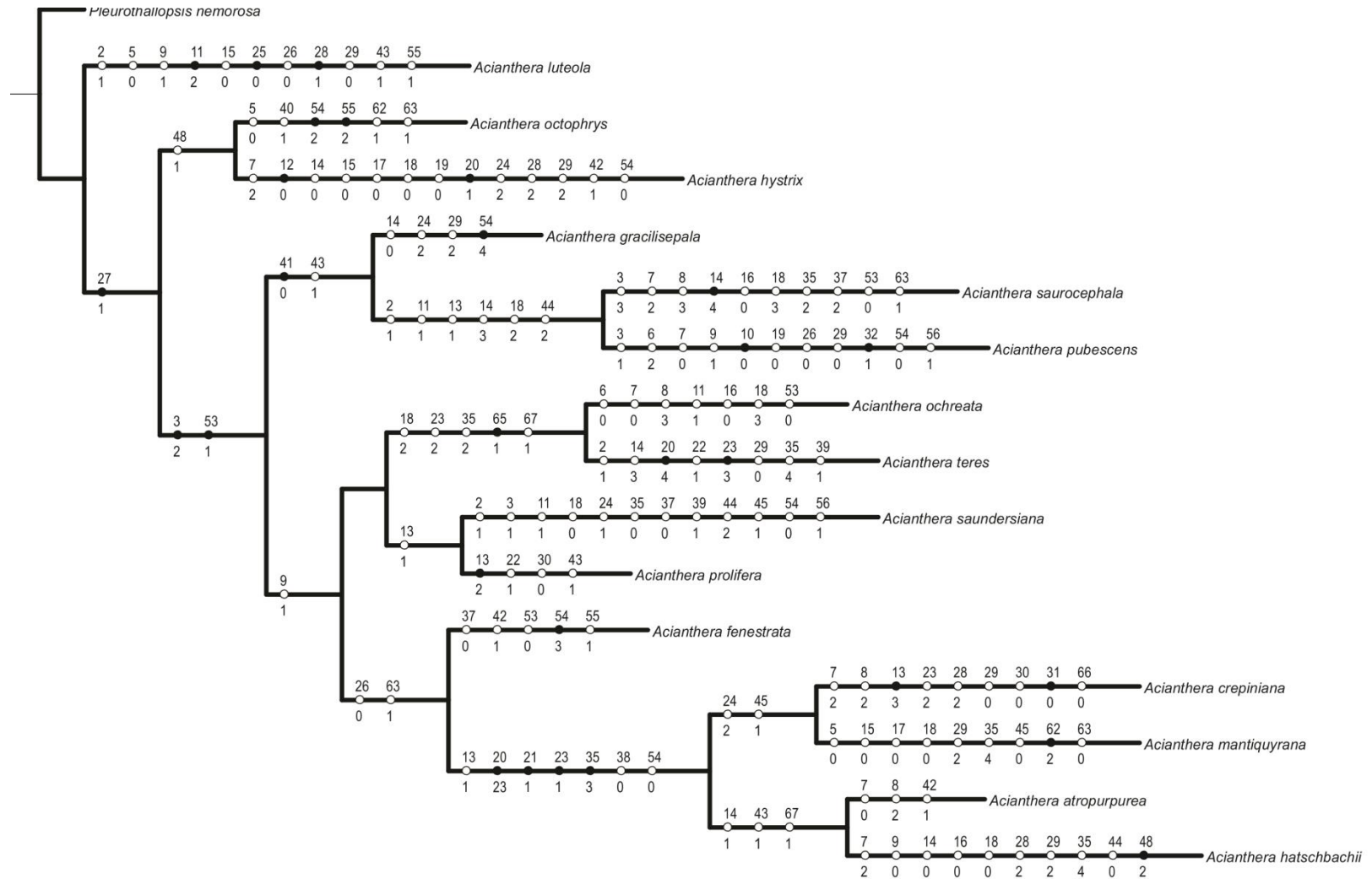


**Fig. 9** Árvore de consenso estrito da análise de Máxima Parcimônia obtida através da análise dos dados moleculares das regiões MatK do DNA de cloroplastos e ITS do DNA ribossômico nuclear, dos dados anatômicos dos órgãos vegetativos e dos dados micromorfológicos florais de *Acianthera*. Suporte de bootstrap acima de 50 está representado nos ramos.



**Fig. 10** Árvore de consenso estrito da análise Bayesiana obtida através da análise dos dados moleculares das regiões MatK do DNA de cloroplastos e ITS do DNA ribossômico nuclear, dos dados anatômicos dos órgãos vegetativos e dos dados micromorfológicos florais de *Acianthera*. Valores de probabilidade posterior estão indicados nos ramos.





**Fig. 11** Árvore de consenso estrito winclada, indicando nos ramos as apomorfias (elipses pretas) e as homoplasias (elipses brancas) exclusivas de cada clado.

**Tabela 1.** Espécimes de *Acianthera* utilizados na análise anatômica e micromorfológica floral.

Táxon	Seção	Voucher
<i>Pleurothallopsis nemorosa</i> (Barb. Rodr.) Porto & Brade	Grupo externo	Toscano de Brito, A.L.V. 3414 UPCB
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sulcatae</i>	Almeida, A.B.R. 011 HUCP
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sulcatae</i>	Almeida, A.B.R. 026 HUCP
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sulcatae</i>	Almeida, A.B.R. 025 HUCP
<i>A. octophrys</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Tomentosae</i>	Toscano de Brito, A. L. V. 3410 UPCB
<i>A. fenestrata</i> (Barb. Rodr.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Cryptophoranthae</i>	Almeida, A.B.R. 036 HUCP
<i>A. fenestrata</i> (Barb. Rodr.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Cryptophoranthae</i>	Klein, J. 067 UPCB
<i>A. hystrix</i> (Kraenzl.) F. Barros	<i>Crinitae</i>	Toscano de Brito, A. L. V. 2893 UPCB
<i>A. atropurpurea</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 020 HUCP
<i>A. hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 03 HUCP
<i>A. hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Kersten, R. A. HUCP 18411
<i>A. hatschbachii</i> (Schltr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 021 HUCP
<i>A. crepiniana</i> (Cogn.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 05 HUCP
<i>A. mantiquyrana</i> (Barb. Rodr.) V. T. Rodrigues & F. Barros	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 02 HUCP
<i>A. saurocephala</i> (Lodd.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 07 HUCP
<i>A. saurocephala</i> (Lodd.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 027 HUCP
<i>A. gracilisepala</i> (Brade) Luer	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 01 HUCP
<i>A. pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 04 HUCP
<i>A. pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Oliveira, L.R. L 022
<i>A. pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Oliveira, L.R. L 029
<i>A. pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 028 HUCP
<i>A. saundersiana</i> (Rchb.f.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sicarie</i>	Almeida, A.B.R. 034 HUCP
<i>A. prolifera</i> (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sicarie</i>	Almeida, A.B.R. 014 HUCP
<i>A. prolifera</i> (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sicarie</i>	Koene, F.M. 001
<i>A. ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Tricarinatae</i>	Almeida, A.B.R. 09 HUCP
<i>A. ochreatea</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Tricarinatae</i>	Koene, F.M. 003
<i>A. teres</i> (Lindl.) Borba	<i>Tricarinatae</i>	Almeida, A.B.R. 015 HUCP

**Tabela 2.** Enumeração dos caracteres anatômicos e micromorfológicos florais e seus estados.

- 1- Raiz, velame biestratificado: (0) ausente, (1) presente
- 2- Raiz, exoderme, tipo de espessamento de parede: (0) em "U", (1) em "O"
- 3- Raiz, região cortical, número de camadas: (0) até 6 camadas, (1) 7 camadas, (2) 8 camadas, (3) 9 camadas, (4) 10 camadas
- 4- Raiz, região cortical, presença de idioblastos reticulados: (0) presentes, (1) ausentes
- 5- Raiz, endoderme, tipo de espessamento de parede: (0) em "U", (1) em "O"
- 6- Raiz, endoderme, espessura das paredes: (0) paredes finas a espessas, (1) paredes muito finas, (2) paredes muito espessas
- 7- Raiz, endoderme, número de células de passagem: (0) 1 célula, (1) 2 células, (2) 3 células
- 8- Raiz, número de polos do protoxilema: (0) 5 polos, (1) de 7 a 9 polos, (2) 10 polos, (3) de 15 a 16 polos
- 9- Raiz, presença de ráfides: (0) ausentes, (1) presentes
- 10- Raiz, região medular, tipo de parede: (0) primária, (1) secundária
- 11- Ramicaule, formato em secção transversal: (0) circular, (1) circular sulcado, (2) triangular
- 12- Ramicaule, presença de córtex externo esclerificado: (0) ausente, (1) presente
- 13- Ramicaule, número de camadas corticais esclerificadas: (0) até 2 camadas, (1) 3 camadas, (2) 4 camadas, (3) 5 camadas
- 14- Ramicaule, número total de camadas do córtex: (0) até 7 camadas, (1) 8 a 9 camadas, (2) 10 a 11 camadas, (3) 13 camadas, (4) 16 camadas
- 15- Ramicaule, presença de parênquima aerífero: (0) ausente, (1) presente

- 16- Ramicaule, presença de conteúdo amilífero: (0) ausente, (1) presente
  - 17- Ramicaule, presença de tecido fundamental interfascicular esclerificado: (0) ausente, (1) presente
  - 18- Ramicaule, número de feixes vasculares: (0) até 15 feixes, (1) de 18 a 25 feixes, (2) de 26 a 28 feixes, (3) de 40 a 50 feixes
  - 19- Ramicaule, região medular, tipo de parede: (0) primária, (1) secundária
  - 20- Folha, formato do limbo em secção transversal: (0) semi plana, (1) plana, (2) elíptica, (3) circular
  - 21- Folha, configuração: (0) bifacial, (1) unifacial
  - 22- Folha, distribuição dos estômatos: (0) hipoestomática, (1) anfiestomática
  - 23- Folha, organização dos feixes vasculares: (0) 1 fileira paralela ao maior eixo da folha, (1) círculo concêntrico, (2) 2 fileiras paralelas ao maior eixo da folha, (3) organizados em 3 fileiras paralelas ao maior eixo da folha
  - 24- Folha, tipo da superfície epidérmica em vista frontal: (0) lisa, (1) verrucosa, (2) papilosa
  - 25- Folha, contorno da parede das células epidérmicas em vista frontal: (0) curva, (1) retas
  - 26- Folha, número de células subsidiárias no complexo estomático: (0) até 5 células subsidiárias, (1) 6 células subsidiárias
  - 27- Folha, presença de cicatrizes de tricomas: (0) ausente, (1) presente
  - 28- Folha, tipo de cera epicuticular: (0) camada suave, (1) grânulos, (2) crosta
  - 29- Folha, formato das células epidérmicas em corte transversal: (0) em forma de domo, (1) poligonal, (2) papilosa
  - 30- Folha, presença de hipoderme adaxial: (0) ausente, (1) presente
  - 31- Folha, presença de hipoderme abaxial: (0) ausente, (1) presente
  - 32- Folha, hipoderme abaxial, número de camadas: (0) 1 camada, (1) 2 camadas
  - 33- Folha, hipoderme abaxial, presença de células com paredes espessadas: (0) ausente, (1) presente
  - 34- Folha, presença de parênquima clorofiliano heterogêneo: (0) ausente, (1) presente
  - 35- Folha, número de camadas do mesófilo: (0) até 15 camadas, (1) de 17 a 20 camadas, (2) de 25 a 26 camadas, (3) de 28 a 30 camadas, (4) de 35 a 36 camadas
  - 36- Folha, células da epiderme e mesófilo sobre a nervura central distintamente modificadas em relação as demais: (0) ausente, (1) presente
  - 37- Folha, parênquima aquífero, organização das células: (0) uma fileira de células na região adaxial, (1) duas fileiras de células na região adaxial separadas por uma faixa de parênquima clorofiliano, (2) disperso pelo mesófilo
  - 38- Folha, mesófilo, presença de idioblastos traqueoidais com espessamento helicoidal: (0) ausente, (1) presente
  - 39- Folha, formato dos Idioblastos traqueoidais com espessamento helicoidal: (0) cilíndricos, (1) globosos
  - 40- Folha, presença de idioblastos com cristais prismáticos: (0) ausente, (1) presente
  - 41- Folha, presença de idioblastos com ráfides: (0) ausente, (1) presente
  - 42- Sépalas dorsal e laterais, nível de coalescência: (0) livres, (1) parcialmente coalescentes
  - 43- Sépala dorsal, face adaxial, tipo de bordo: (0) inteiro, (1) delimitado
  - 44- Sépala dorsal, face adaxial, ornamentação do bordo: (0) glabro, (1) ciliado, (2) papiloso
  - 45- Sépalas laterais, nível de coalescência: (0) até 1 terço do comprimento, (1) mais de 2 terços do comprimento, (2) totalmente coalescentes
  - 46- Sépalas laterais, presença de mento: (0) ausente, (1) presente
  - 47- Sépalas, formato das células epidérmicas: (0) isodiamétrico, (1) oblongo
  - 48- Sépalas, distribuição dos estômatos: (0) anfiestomáticas, (1) hipoestomáticas, (2) epiestomáticas
  - 49- Sépalas, células apicais diferenciadas das demais: (0) ausentes, (1) presentes
  - 50- Sépalas, tipos de células: (0) células com parede reta, (1) papilas, (2) tricomas
  - 51- Sépalas, tipos de papilas: (0) simples, (1) obpiriformes, (2) cônicas, (3) ovadas, (4) obovadas, (5) com ápice aciculado
  - 52- Labelo, formato geral: (0) trilobado, (1) inteiro
  - 53- Labelo, formato dos lobos laterais: (0) arredondados, (1) apiculados
  - 54- Labelo, formato do ápice: (0) arredondado, (1) obtuso, (2) retuso, (3) truncado, (4) agudo
  - 55- Labelo, tipo de bordo: (0) serreado, (1) inteiro, (2) ciliado
  - 56- Labelo, face adaxial, superfície homogênea: (0) ausente, (1) presente
  - 57- Labelo, formato das células epidérmicas: (0) oblongo, (1) poligonal, (2) isodiamétrico
  - 58- Labelo, tipo das células: (0) células com parede reta, (1) papilas, (2) tricomas
  - 59- Labelo, tipo das papilas: (0) simples, (1) cônicas, (2) ovadas, (3) imbricadas, (4) obpiriformes
  - 60- Labelo, tipo de cutícula: (0) lisa, (1) ornamentada
  - 61- Labelo, ornamentação da cutícula: (0) estrias longitudinais, (1) estrias irregulares, (2) estrias concêntricas, (3) estrias transversais, (4) reticulada
  - 62- Pétala, formato: (0) oblanceolada, (1) deltóide, (2) linear
  - 63- Pétala, tipo de bordo: (0) serreado, (1) inteiro
  - 64- Pétala, formato das células epidérmicas: (0) oblongo, (1) isodiamétrico
  - 65- Pétala, tipo das células epidérmicas: (0) células com parede reta, (1) papilas
  - 66- Coluna, tipo de bordo: (0) liso, (1) denticulad
  - 67- Coluna, tipo das células epidérmicas: (0) células com parede reta, (1) papilas
  - 68- Coluna, ornamentação da cutícula: (0) lisa, (1) ornamentada
-

**Tabela 3.** Matriz de caracteres usada na análise cladística dos dados anatômicos vegetativos e micromorfológicos florais de *Acianthera*.

Especies	Caracteres
<i>P. nemorosa</i>	10011020010100111010000011001110010000-1100000(0 1)01(0 1 2)(0 1)00000(0 1)1(0 1 2)(0 1)(0 1 2)0000001
<i>A. luteola</i>	1111011111210101111000010001011010001100101011(0 1)000?00110(0 2)(0 1 2)(0 3)(0 1)00000101
<i>A. octophrys</i>	101101110101011111100000110111010001101100111(0 1)10(1 2)(0 2)00220(0 2)(1 2)(0 1)(0 1 3)11(0 1)0001
<i>A. fenestrata</i>	1020101111010211111000001010111000110100110221(0 1)11(0 1 2)(0 1 2 3 4)00310(0 2)(0 1)(0 1)(0 1)(0 4)0100101
<i>A. hystrix</i>	101111210100-00100010002111221100010110011??10?10(1 2)(0 2)0000?????00??0??
<i>A. atropurpurea</i>	1021110211011111111131-1010101110003-20-0111220(0 1)101(0 2 5)1?000(0 2)(0 1)(0 3)1(0 4)01(0 1)(0 1)111
<i>A. hatschbachii</i>	103010210101101010131-1010122110004-20-0101020020(0 1)(0 2 5)1?001(0 1)10(0 1)401(0 1)(0 1)11(0 1)
<i>A. crepiniana</i>	103110221101321111121-221012000--03020-0100110(0 1)01(0 1)(0 2 5)01001(0 1)10(0 1)(0 1 3)01(0 1)0001
<i>A. mantiquyrana</i>	103101111101120100131-1210102110004020-0100200(0 1)001(0 2)1?001(0 1)101?200010(0 1)
<i>A. saurocephala</i>	113011230111141013100000110111010212100001210(0 1)01(0 1 2)(0 2 3 4 5)00100(0 2)(0 1 2)(0 3)(0 1)(0 1 4)11(0 1)0101
<i>A. gracilisepala</i>	1020111201010011111000021110211010111100001020(0 1)01(0 1 2)(0 2)01400(0 1)(0 1 2)(0 1)10(0 1)0101
<i>A. pubescens</i>	1110120110111311120000011010011110101100001210(0 1)01(1 2)(0 2 5)01001(0 2)1(0 1)(0 1)(0 4)00(0 1)(0 1)1(0 1)1
<i>A. saundersiana</i>	11111211111121110100001110111010000110100211(0 1)01(0 1 2)(0 1 2)01001(0 2)1(0 4)(0 1)40000101
<i>A. prolifera</i>	1030121111012211111001001110101010112100101021(0 1)01(1 2)(0 1 2)01100(0 2)(1 2)(0 1 4)(0 1)(0 1)000(0 1)1(0 1)1
<i>A. ochreatea</i>	1030100311110210131000201110111000212100100021(0 1)01(0 1)000100(0 2)1(0 1 3)(0 1)(0 1)00(0 1)1111
<i>A. teres</i>	1131121111010311121401301110011000402110100021(0 1)01(1 2)(0 1)01100(0 2)1(0 3)(0 1)(0 1)0001111

**Tabela 4.** Resultados das análises cladísticas dos dados anatômicos vegetativos, micromorfológicos florais e moleculares, separados e combinados.

	Matriz de dados vegetativos	Matriz de dados florais	Matriz de dados moleculares (ITS e MatK)	Matriz combinada (morfológica vegetativa e molecular)	Matriz combinada morfológica floral e molecular
Número de taxa	16	16	16	16	16
Número de caracteres	40	28	1512	1553	1539
Comprimento da árvore	132	56	363	515	432
Número de árvores retidas	3	7	12	1	1
Índice de consistência (IC)	0.5	0.4	0.7	0.6	0.7
Índice de retenção (IR)	0.4	0.5	0.6	0.5	0.5

## **CAPÍTULO II - Desenvolvimento e função dos tricomas radiculares em *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**

(Aceito para publicação na Australian Journal of Basic and Applied Sciences)

### **RESUMO**

**Introdução:** Os tricomas radiculares são projeções tubulares originadas através do alongamento das células epidérmicas, eles têm sido estudados em muitas espécies de plantas vasculares, porém em Orchidaceae os registros destas estruturas são escassos e sua função não tem sido esclarecida. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento dos tricomas radiculares em Orchidaceae, registrando a ocorrência destas estruturas em diferentes espécies de *Acianthera*, além de buscar elucidar a função desempenhada por estas estruturas. **Material e Métodos:** Lâminas histológicas permanentes e semi-permanentes das raízes de 12 espécies de *Acianthera*, englobando sete das 10 seções do gênero, foram coradas com dupla coloração ou azul de toluidina e analisadas em microscopia de luz e microscopia de fluorescência. Amostras foram submetidas a testes histoquímicos com PAS, vermelho de rutênio e floroglucinol acidificado. Amostras de raízes foram processadas e analisadas em MEV. **Resultados:** *Acianthera* apresenta raízes com velame biestratificado. Tricomas radiculares simples ou espiralados desenvolvem-se no epivelame, apenas nas regiões de contato das raízes com o substrato. Os tricomas radiculares de *Acianthera* permanecem presentes mesmo após o processo de alongamento e desenvolvimento da raiz. Tanto os tricomas simples como os tricomas espiralados apresentaram reação positiva para floroglucinol, PAS e vermelho de rutênio. **Conclusão:** As análises permitem-nos concluir que os tricomas radiculares são originados na camada mais externa do velame na face que está em contato direto com o substrato. Estas estruturas não são efêmeras e permanecem presentes mesmo após o completo desenvolvimento da raiz. Os tricomas radiculares espiralados apresentam paredes celulares secundárias e são a fase final de diferenciação dos tricomas radiculares. Os tricomas radiculares simples e espiralados atuam na adesão da planta ao substrato e auxiliam a absorção de água e nutrientes pelas raízes.

**Palavras - chave:** Velame; Ontogênese; Tricomas espiralados; Fixação; Absorção.

### 3.1 Introdução

Os tricomas radiculares são projeções tubulares originadas através do alongamento das células epidérmicas, estas estruturas proporcionam melhor fixação da planta ao solo além de aumentar a área de absorção de nutrientes (Gilroy & Jones, 2000). Eles desenvolvem-se e estão presentes em regiões próximas à zona apical (Dickison, 2000) e seu desenvolvimento ocorre em quatro etapas: especificação do destino celular, iniciação, crescimento apical e maturação (Gilroy & Jones, 2000; Forde & Lorenzo, 2001). Estudos sobre o desenvolvimento dos tricomas radiculares em angiospermas são principalmente sobre o aspecto fisiológico (Peterson & Farquhar, 1996; Forde e Lorenzo, 2001; Ma et al., 2001) e molecular (Gilroy & Jones, 2000; Shi & Zhu, 2002; Mozahim et al., 2014).

As raízes de Orchidaceae apresentam-se revestidas por uma epiderme múltipla, denominada velame, cujas principais funções estão relacionadas à absorção, armazenamento de água e nutrientes, bem como a proteção radicular (Benzing et al., 1983). O velame é uma característica típica das raízes dos representantes epífitos da família Orchidaceae, embora também ocorra em orquídeas terrestres (Toscano de Brito & Cribb, 2005; Stern, 2014).

A presença de tricomas radiculares em Orchidaceae raramente é mencionada na literatura (Leitgeb, 1865; Groom, 1893; Morris et al., 1996; Carlswald et al., 2006; Chomicki et al., 2014; Stern, 2014), assim como, os seus tipos morfológicos. Tricomas radiculares simples e espiralados foram registrados para algumas espécies da família, no entanto, a distribuição dos diferentes tipos de tricomas radiculares não é conhecida e a falta de estudos ontogenéticos e fisiológicos destas estruturas dificultam a interpretação de sua função (Bernal et al., 2015).

*Acianthera* Scheidw. pertence à subtribo Pleurothallidinae, compreende 291 espécies distribuídas na América do Sul (Karremans, 2016), e é um importante gênero de representantes epífitos. Estudos anatômicos da raiz de *Acianthera* são restritos a algumas espécies (Pridgeon, 1982; Scatena & Nunes, 1996) e tricomas radiculares não foram relatados. Em Pleurothallidinae, os tricomas radiculares foram registrados apenas em *Dresslerella* (Pridgeon & Williams, 1979).

Considerando a falta de estudos sobre o desenvolvimento dos tricomas radiculares em Orchidaceae, o objetivo deste trabalho foi descrever o desenvolvimento dos tricomas radiculares, registrar a ocorrência destes tricomas nas

raízes de *Acianthera*, além de buscar elucidar a função desempenhada por estas estruturas.

### 3.2 Material e métodos

Foram analisadas raízes de 13 espécies de *Acianthera* englobando sete das 10 seções do gênero (tabela 1). Foram coletadas raízes que estavam crescendo fixas ao substrato e raízes que não estavam em contato direto com este. Para as análises em microscopia de luz, secções transversais e longitudinais do material fresco ou fixado em FAA 50% (Johansen, 1940) foram obtidas a mão livre com o auxílio de lâminas de barbear e coradas com azul de alcian e fucsina básica (Luque et al., 1996). Amostras também foram processadas em Histoiresina Leica conforme orientações do fabricante e coradas com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964). As amostras foram submetidas aos seguintes testes histoquímicos: vermelho de rutênio para a detecção de mucilagens ácidas (Gregory and Baas, 1989), PAS para a detecção de polissacarídeos totais insolúveis (McManus, 1948) e floroglucinol acidificado para a detecção de lignina (Foster, 1949). O registro fotográfico foi realizado com microscópio Olympus SC30 com câmera digital acoplada e software analySISgetIT.

A autofluorescência das paredes celulares dos tricomas radiculares foi testada através de análises em microscopia de fluorescência (Liu et al., 1994), para isso utilizou-se filtro RFP ou Texas red no microscópio Olympus BX51 acoplado com câmera fotográfica Olympus DP72. Além disso, as amostras também foram observadas no microscópio confocal Nikon A1RSiMP (NIKON, Tokyo, Japan), para a visualização das imagens utilizou-se o programa Imaging Software NisElements 4.20 (NIKON, Tokyo, Japan).

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura o material foi fixado em FAA 50%, desidratado em séries etílicas, submetido ao ponto crítico e metalizado com ouro. As análises e o registro eletromicrográfico foram realizados com o microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU.



**Tabela 1.** Lista de espécies de *Acianthera* Scheidw. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) analisadas.

Táxon	Seção	Voucher
<i>Acianthera aphotosa</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sicariae</i>	Koene, F.M. 009 UPCB
<i>Acianthera atropurpurea</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 020 HUCP
<i>Acianthera crepiniana</i> (Cogn.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 05 HUCP
<i>Acianthera fenestrata</i> (Barb. Rodr.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Cryptophoranthae</i>	Almeida, A.B.R. 036 HUCP
<i>Acianthera gracilisepala</i> (Brade) Luer	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 01 HUCP
<i>Acianthera hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 03 HUCP
<i>Acianthera hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Kersten, R.A. HUCP18411
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sulcatae</i>	Almeida, A.B.R. 011 HUCP
<i>Acianthera mantiquyrana</i> (Barb. Rodr.) V. T. Rodrigues & F. Barros	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 02 HUCP
<i>Acianthera octophrys</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Tomentosae</i>	Toscano de Brito, A.L.V. 3410 UPCB
<i>Acianthera prolifera</i> (Herb. ex Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Sicariae</i>	Almeida, A.B.R. 014 HUCP
<i>Acianthera pubescens</i> (Lindl.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 04 HUCP
<i>Acianthera saurocephala</i> (Lodd.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 027 HUCP
<i>Acianthera saurocephala</i> (Lodd.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 07 HUCP
<i>Acianthera teres</i> (Lindl.) Borba	<i>Tricarinatae</i>	Almeida, A.B.R. 015 HUCP

### 3.3 Resultados

As espécies analisadas apresentam velame biestratificado com endovelame formado por células de paredes finas e epivelame formado por células cuja parede periclinal interna apresentou espessamento fortemente lignificado (Fig. 1A). Os tricomas radiculares foram observados na camada mais externa do velame (Fig. 1B).

Os tricomas foram observados em toda a extensão da raiz, próximos ao ápice radicular e em regiões distais da raiz (Fig. 1C). Os tricomas radiculares desenvolvem-se voltados para o substrato como observado nas figuras 1C, 1F e 1J onde restos do substrato podem ser observados aderidos às extremidades. Regiões das raízes que não tinham contato direto com o substrato não apresentaram tricomas (Fig. 1B).

Em regiões próximas ao ápice foram observadas células epidérmicas com protuberância na parede periclinal externa (Fig. 1D) e tricomas radiculares curtos e livres do substrato. Em regiões mais distais foram observados tricomas em fase de crescimento apical com citoplasma concentrado no ápice (Fig. 1E, seta). Os tricomas radiculares totalmente desenvolvidos apresentaram-se aderidos ao substrato (Fig. 1C, 1F) e apresentaram a parede celular inteira ou rompida em espiral (Figs. 1G, 1H).

Os tricomas radiculares apresentaram reação ao floroglucinol acidificado e paredes celulares autofluorescentes quando analisados em microscopia de



fluorescência (Fig. 1I). Os tricomas radiculares reagiram positivamente com PAS e vermelho de rutênio (Fig. 1J) indicando a presença de polissacarídeos totais insolúveis e mucilagens ácidas.

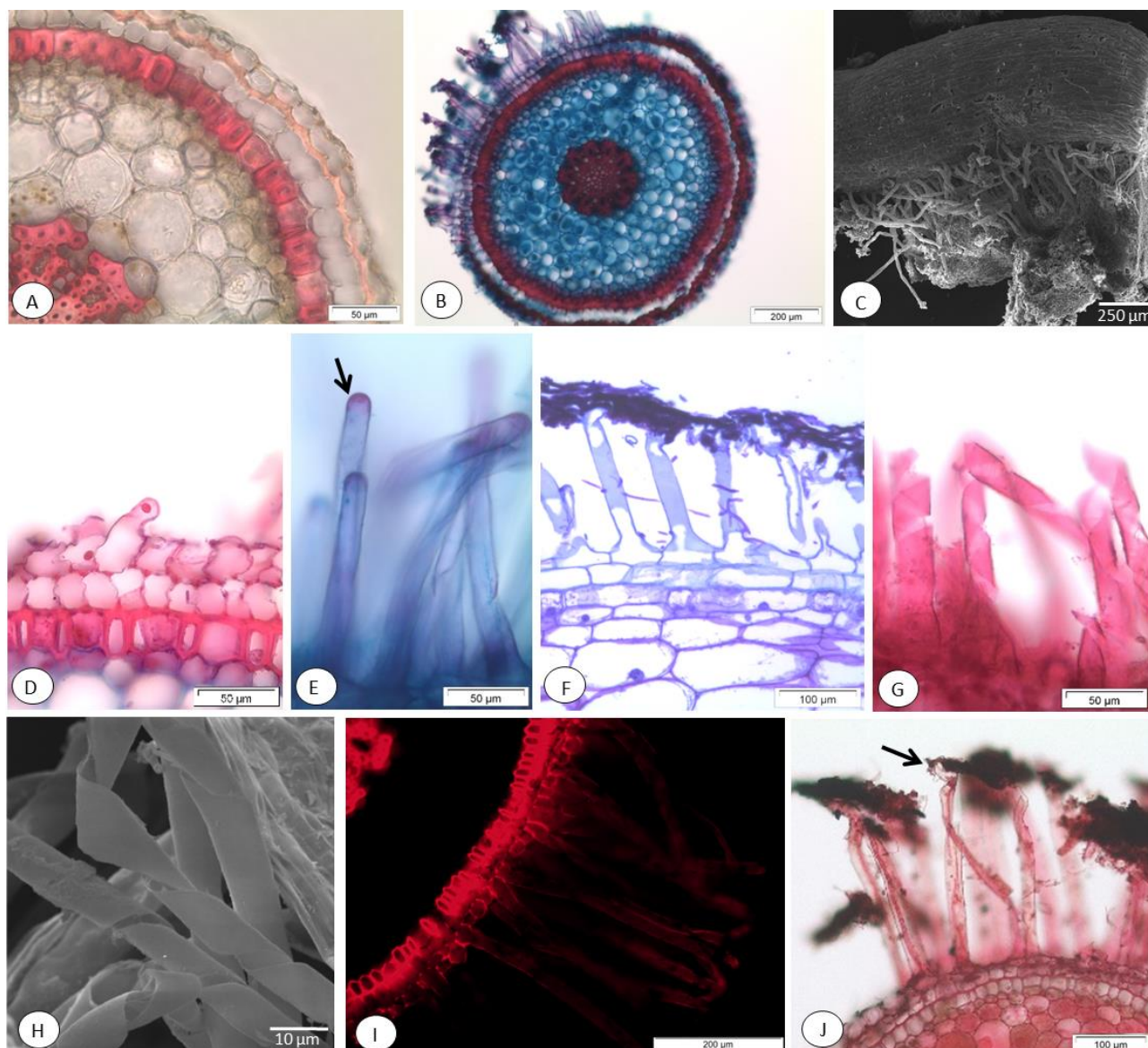


Figura 1 – Raízes de *Acianthera* em microscopia de luz (A-B, D-G, J) e Microscopia eletrônica de varredura (C, H). A Velame biestratificado de *Acianthera luteola* com espessamento lignificado na parede periclinal interna evidenciado pelo teste com floroglucinol acidificado. B Tricomas radiculares desenvolvidos de *A. crepiniana*. C Visão geral da raiz de *A. aphtosa* com tricomas radiculares somente voltados para o substrato. D Tricomas radiculares na fase inicial de desenvolvimento de *A. gracilisejala*. E Tricomas radiculares em fase de crescimento apical com citoplasma concentrado no ápice (seta) de *A. crepiniana*. F Secção longitudinal da raiz de *A. aphtosa* com tricomas simples desenvolvidos aderidos ao substrato. G Tricomas radiculares espiralados de *A. crepiniana* com o teste de PAS. H Tricomas espiralados de *A. pubescens*. I Tricomas radiculares de *A. aphtosa* observados em microscopia de fluorescência. J Tricomas aderidos ao substrato (seta) em *A. aphtosa* com o teste de vermelho de rutênio.

### 3.4 Discussão

Todas as raízes analisadas apresentaram tricomas na região apical e nas regiões que estavam em contato direto com o substrato. Os tricomas radiculares desenvolvem-se nas regiões próximas ao ápice radicular e são comuns em grande parte das plantas vasculares, porém são efêmeros, sendo restritos a região apical (Dickison, 2000; Evert, 2006). No entanto, considerando a localização dos tricomas radiculares observados em *Acianthera*, estas estruturas são persistentes no decorrer do desenvolvimento da raiz, uma vez que elas estão presentes mesmo em regiões distantes do ápice radicular.

Os tricomas radiculares são originados a partir de células epidérmicas denominadas de tricoblastos, a determinação se a célula epidérmica irá se tornar ou não um tricoblasto é a primeira fase da ontogênese destas estruturas (Forde & Lorenzo, 2001). A segunda fase do desenvolvimento dos tricomas radiculares é denominada iniciação, e caracteriza-se pela formação de uma protuberância em um dos lados da parede celular (Gilroy & Jones, 2000), a presença de tricomas em fase de iniciação como registrado neste trabalho (Fig. 1D), indica que os tricomas radiculares em Pleurothallidinae são originados na camada mais externa do velame.

A fase de crescimento dos pelos radiculares, denominada crescimento apical, é um processo genético e fisiologicamente distinto da fase de iniciação (Gilroy & Jones, 2000). Em plantas terrestres, o desenvolvimento radicular, bem como a quantidade de tricomas radiculares e o seu comprimento varia de acordo com a distribuição de nutrientes inorgânicos no solo (Forde & Lorenzo, 2001; Ma et al., 2001; Nozulaidi et al., 2015; Idress et al., 2016), no entanto, em espécies epífitas de Orchidaceae o desenvolvimento destas estruturas parece está relacionado ao contato da raiz aérea, pois os tricomas radiculares só se desenvolvem na face radicular que está em contato com o substrato, conferindo a estas estruturas a função de fixação das raízes e da planta, fato que foi sugerido por Groom (1893), Stern (2014) e Chomicki et al., (2014).

Em Orchidaceae os tricomas radiculares podem ser simples (Pridgeon & Williams, 1979), ramificados ou espiralados (Leitgeb, 1865). Em *Acianthera* foram observados tricomas radiculares simples e espiralados, estes últimos diferem dos tricomas espiralados descritos por Leitgeb (1865) para outras espécies de Orchidaceae, porém assemelham-se aos tricomas espiralados de *Eria* sp. (Janczewski, 1885) e de Spirantinae (Bernal et al., 2015). Com base em nossos

registros de tricomas radiculares em diferentes fases de desenvolvimento, podemos afirmar que os tricomas radiculares espiralados são a fase final de diferenciação dos tricomas radiculares em Pleurothallidinae, pois o alongamento destas estruturas propicia o rompimento da parede celular em espiral (Lersten & Curtis, 1977).

Diferentemente dos tricomas espiralados presentes nas folhas de Rosaceae, Betulaceae e Rubiaceae que permanecem com a parede interna contínua e possivelmente retenham o protoplasto na maturidade (Lersten & Curtis, 1977), os tricomas radiculares espiralados registrados para *Acianthera*, assim como os tricomas radiculares de Spirantinae (Bernal et al., 2015), apresentam paredes totalmente rompidas em espiral e não retêm o protoplasto na fase final de desenvolvimento. Assim, acreditamos que as paredes celulares em espiral destes tricomas podem propiciar melhor aderência e plasticidade às raízes das plantas epífitas, evitando que elas se desprendam do substrato por estresse mecânico.

Lersten & Curtis (1977) sugeriram que a parede externa rompida representa a parede primária original dos tricomas espiralados, no entanto, a reação positiva dos tricomas radiculares com floroglucinol acidificado e a autofluorescência apresentada pelas paredes celulares de alguns tricomas simples e dos tricomas espiralados, indicam que ocorre a deposição de lignina nas paredes celulares dos tricomas simples e o consequente rompimento da parede celular. Assim, podemos afirmar que os tricomas radiculares espiralados presentes em Pleurothallidinae apresentam paredes celulares secundárias rompidas em espiral.

Os testes histoquímicos com PAS e vermelho de rutênio demonstram a presença de polissacarídeos totais insolúveis e mucilagens ácidas recobrando os tricomas radiculares presentes nas espécies analisadas. A presença de substâncias PAS-positivas recobrando as raízes indicam que estas funcionam como raízes adesivas atuando na aderência da planta ao substrato (Badalamenti et al., 2015), já a mucilagem pode ser encontrada formando um filme nas raízes e tricomas radiculares, desempenhando importante papel na captação de água e nutrientes (Oades, 1978). Neste sentido, os tricomas radiculares presentes em Pleurothallidinae desempenham a função de fixação da planta ao substrato, além de auxiliar na absorção de água e nutrientes pela raiz.

### 3.5 Conclusão

Nossos registros permitem-nos concluir que os tricomas radiculares atuam na absorção de água e nutrientes e na adesão das plantas ao substrato. Estas estruturas não são efêmeras e permanecem presentes mesmo após o completo desenvolvimento da raiz. A localização dos tricomas radiculares em início de desenvolvimento indica que eles são originados na camada mais externa do velame e o seu desenvolvimento pode está relacionado ao contato da raiz aérea com o substrato. Os tricomas espiralados são a fase final de diferenciação dos tricomas radiculares e são originados pelo alongamento das células epidérmicas, deposição de parede secundária lignificada e rompimento da parede celular em espiral.

### 3.6 Referências

- Badalamenti, F., A. Alagna and S. Fici, 2015. Evidences of adaptive traits to rocky substrates undermine paradigm of habitat preference of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanic*. Scientific Reports, n.5, 08804.
- Benzing, D.H., W.E. Friedman, G. Peterson and A. Renfrow, 1983. Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. American Journal of Botany, 70(1): 121-133.
- Bernal, A.A., E.C. Smidt and C. Bona, 2015. Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). Brazilian Journal of Botany, 38(2): 411-415.
- Carlswald, B.S., W.L. Stern and B. Bytebier, 2006. Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. Botanical Journal of the Linnean Society, 151(2): 165-218.
- Chomicki, G., L.P.R. Bidel and C. Jay-Allemand, 2014. Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylaxlindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. Flora, 209(2): 88-94.
- Dickson W. C., 2000. Integrative plant anatomy. Academic Press.
- Evert R.F., 2006. Esau's plant anatomy. 3rd ed. Wiley, New Jersey.
- Foster, A.S. 1949. Practical plant anatomy. D. van Nostrand Company Inc., Princeton.
- Forde B. and H. Lorenzo, 2001. The nutritional control of root development. Plant and Soil, 232(1): 51-68.
- Gilroy, S. and D.L. Jones, 2000. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. Trends in Plant Science, 5(2): 56 – 60.
- Gregory M. and P. Baas, 1989. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel Journal of Botany, 38(2-3): 125-174.
- Groom, P., 1893. Botanical notes, n° 4 – On the velamen of orchids. Annals of Botany, 7(25): 143-151.
- Idress A., A. Gehani and T.M. Ismail, 2016. Effect of soil amendment on growth and physiological processes of rocket (*Eruca Sativa* L.) grown under salinity conditions. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 10(1): 15-20.
- Janczewski, E., 1885. Organisation dorsiventrale dans les racines des Orchidees. Annales des Sciences Naturalles 2: 1834-1937.

- Lersten, N.R. and J.D. Curtis, 1977. Preliminary report of outer wall helices in trichomes of certain dicots. *Canadian Journal of Botany* 55(2): 128–132.
- Johansen D.A., 1940. *Plant microtechnique*. New York: McGraw Hill Book.
- Karremans, A.P., 2016. Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana*, 16(2): 219-241.
- Leitgeb H., 1865. *Die luftwurzeln der orchideen*. 1850–1918.
- Liu, L., J.F.D. Dean, W.E. Friedman and K.E.L. Eriksson, 1994. A laccase-like phenoloxidase correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *The Plant Journal*, 6(2): 213-224.
- Luque, R.L., H.C. Sousa and J.E. Kraus, 1996. Métodos de coloração de Roeser (1972) -modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de alciano 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica*, 10(2): 199-212.
- Ma, Z., D.G. Bielenberg, K.M. Brown and J.P. Lynch, 2001. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 24(4): 459-467.
- McManus, J.F.A., 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Biotechnic & Histochemistry*. 23(3): 99-108.
- Morris, M.W., W.L. Stern and W.S. Judd, 1996. Vegetative anatomy and systematic of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 120(2): 89-114.
- Mozahim K., A. Mallah and H.M. Masyab, 2014. Expression of GUS and GFP reporter genes in transgenic hairy roots of tomato and potato plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(2): 234-239.
- Nozulaidi M., M. Khairi and M.S. Jahan, 2015. Effects of different salinity levels on rice production. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 9(5): 524-530.
- Oades, J.M., 1978. Mucilages at the root surface. *European Journal of Soil Science*, 29(1): 1-16.
- O'Brien T.P, N. Feder and M.E. McCully, 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, 59(2): 368-373.
- Peterson, R.L. and M.L. Farquhar, 1996. Root hairs: Specialized tubular cells extending root surfaces. *The Botanical Review*, 62(1): 1-40.
- Pridgeon, A.M. and N.H. Williams, 1979. Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). *Selbyana*, 5(2): 120-134.
- Pridgeon A.M., 1982. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, 69(6): 981-938.
- Scatena, V.L. and A.C. Nunes, 1996. Anatomia de *Pleurothallis rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo*, 15: 35-43.
- Shi, H. and J.K. Zhu, 2002. SOS4, A pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129(2): 585–593.
- Stern, W.L., 2014. *Anatomy of the Monocotyledons Volume X: Orchidaceae*. Oxford University Press, Oxford.

### **CAPÍTULO III - Anatomia floral de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**

(A ser submetido à Revista Plant Systematics and Evolution)

#### **RESUMO**

Estudos moleculares recentes dividiram *Acianthera* em dez seções, dentre elas *Acianthera* seção *Pleurobotryae* que engloba quatro espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pleurobotryum*. As flores de *Acianthera* apresentam caracteres morfológicos variáveis, mesmo entre os representantes da mesma seção e poucos estudos de anatomia floral foram realizados em representantes do gênero. Assim, flores das quatro espécies de *Acianthera* seção *Pleurobotryae* e de outras espécies pertencentes a outras seções, foram analisadas em microscopia de luz e em microscopia eletrônica de varredura e submetidas a testes histoquímicos para a detecção de tecidos secretores. As flores das espécies analisadas, apresentam pétalas reduzidas com um feixe vascular colateral, as sépalas e o labelo apresentam três feixes vasculares. Poros estomáticos estão presentes no ápice das sépalas. O labelo apresentou cutícula com diferentes tipos de ornamentações e com poros e rupturas. Em todos os representantes de *A. seção Pleurobotryae*, a base e o sulco central do labelo apresentaram células com características de nectários. As sépalas e o labelo de todas as espécies analisadas apresentaram células papilosas e tricomas que podem atuar na emissão de odores. A presença de tecidos produtores de néctar no labelo das espécies de *A. seção Pleurobotryae*, é uma característica floral compartilhada entre os representantes desta seção, pois as demais espécies analisadas não apresentaram esta característica. Assim, as espécies de *A. seção Pleurobotryae* podem atrair os polinizadores pela emissão de odores e recompensá-los produzindo néctar, enquanto que as demais espécies analisadas podem atrair os polinizadores pela emissão de odores e não oferecer recompensas florais.

**Palavras-chave:** Labelo · Nectários · Osmóforos · *Pleurobotryum* · *Pleurothallis*

#### **4.1 Introdução**

O gênero *Acianthera* Scheidw. pertence à subtribo Pleurothallidinae Lindl. Ex G. Don., formada por 5.100 espécies o que equivale a 20% de todas as orquídeas (Karremans 2016). Após a realização de estudos moleculares e filogenéticos de representantes de Pleurothallidinae e da confirmação do polifiletismo do gênero

*Pleurothallis* R. Br., *Acianthera* foi reestabelecido como gênero (Pridgeon & Chase 2001). *Acianthera* é formado por 291 espécies distribuídas na América do Sul (Karremans 2016) e bem representadas no Brasil, onde ocorrem 125 espécies, destas aproximadamente 85% são endêmicas do território brasileiro (Barros et al. 2015).

Baseados em dados moleculares, Chiron & van den Berg (2012) dividiram *Acianthera* em dez seções, dentre elas *A. seção Pleurobotryae* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg, que de acordo com esta proposta, seria formada por sete espécies anteriormente pertencentes ao gênero *Pleurobotryum* Barb. Rodr.. Em recente revisão taxonômica para a seção, Rodrigues et al. (2015) constataram que apenas quatro espécies podem ser claramente diferenciadas como representantes de *A. seção Pleurobotryae*: *Acianthera atropurpurea* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg, *A. hatschbachii* (Schltr.) Chiron & van den Berg, *A. Crepiniana* (Cogn.) Chiron & van den Berg e *A. mantiquyrana* (Barb. Rodr.) V.T. Rodrigues & F. Barros.

Ao propor a criação de *A. seção Pleurobotryae*, Chiron & van den Berg (2012) afirmaram que a presença de labelo unguiculado seria a característica mais notável do grupo. A filogenia de *A. seção Pleurobotryae* baseada em dados moleculares (Rodrigues et al. no prelo), aponta que as quatro espécies aceitas para a seção formam um clado monofilético. Assim, as espécies de *A. seção Pleurobotryae* poderiam ser caracterizadas pela combinação de caracteres vegetativos e não pelo labelo unguiculado como proposto anteriormente (Rodrigues et al. no prelo). De acordo com as análises filogenéticas de Rodrigues et al. (no prelo), *A. gracilisepala* (Brade) Luer, que nas análises de Chiron e van den Berg (2012) permaneceu com posicionamento incerto, pertence a *Acianthera* seção *Acianthera* e *A. octophrys* (Rchb. f.) Pridgeon & M. W. Chase que apresenta labelo unguiculado pertence à *Acianthera* seção *Tomentosae* Luer.

As orquídeas podem atrair seus polinizadores por meio de estímulos visuais, olfatórios, químicos e estruturais presentes nas flores e recompensá-los com néctar, pólen, ceras e óleos, ou não oferecer nenhum tipo de recompensa floral (Dressler 1993, Singer 2003). As flores de *Pleurothallidinae*, um dos maiores grupos de orquídeas polinizados por *Diptera*, podem apresentar nectários superficiais na base do labelo ou entre a coluna e o labelo (Dressler 1993) e os osmóforos, estruturas responsáveis pela síntese e secreção de fragrâncias, podem ser encontrados no ápice de sépalas e/ou pétalas ou em regiões específicas do labelo (Pridgeon e Stern



1983; Pridgeon e Stern 1985; Teixeira et al. 2004). Os estudos de anatomia floral em orquídeas são escassos se comparados ao número de espécies da família (Leitão et al., 2014) e a presença de nectários e osmóforos em flores de *Acianthera* tem sido registrada para poucas espécies do gênero (Melo et al. 2010, Cardoso 2014).

As flores de *Acianthera* apresentam caracteres morfológicos variáveis mesmo entre os representantes da mesma seção, como é o caso das espécies pertencentes à *A. seção Pleurobotryae* que apresentam variações na coloração, no formato e no nível de coalescência entre as sépalas. Como a presença de estruturas secretoras e de caracteres anatômicos florais compartilhados entre os representantes de *A. seção Pleurobotryae* é desconhecida, os objetivos deste estudo foram: descrever a anatomia floral dos representantes de *A. seção Pleurobotryae*; identificar a presença de estruturas secretoras; comparar anatomia floral destas espécies com a anatomia floral apresentada por *A. gracilispala* e *A. octophrys*.

## 4.2 Material e Métodos

Flores em antese das quatro espécies de *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, de *A. gracilispala* e de *A. octophrys* (Tabela 1) foram coletadas e fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965). Flores frescas de *A. crepiniana*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana* foram coletadas e imersas em vermelho de rutênio a 0.05% (v/v) (Davies e Stpiczynska 2014), lugol (Johansen 1940) e vermelho neutro 0.1% aquoso (Voegel 1962) para a detecção de possíveis regiões secretoras. As imagens foram registradas em Estereomicroscópio Leica MZ16, acoplado a câmera fotográfica Leica DFC 500 com módulo Leica Las 3D View e lasMontage.

Para as análises em microscopia de luz, as flores foram processadas em paraplast e os cortes seriados longitudinais e transversais de 5 a 7  $\mu$ m de espessura foram realizados em micrótomo rotativo. As lâminas foram coradas com dupla coloração utilizando-se os corantes azul de alcian 8GX e fucsina básica (Luque et al., 1996) e montadas em Entellan®.

Ápices das sépalas e labelos inteiros foram processados em Histoiresina Leica de acordo com as instruções do fabricante e os cortes transversais e longitudinais de 3 $\mu$ m de espessura foram realizados em micrótomo rotativo. Os cortes histológicos foram submetidos a testes histoquímicos com lugol (Johansen 1940) para a detecção de amido e com vermelho de rutênio a 0.05% (v/v) para a detecção de



mucilagem (Davies e Stpiczynska 2014). A distribuição do osmóforos nos tecidos foi registrada pela aplicação de vermelho neutro 0.1% aquoso (Voegel 1962) nos cortes em resina. As papilas e os tricomas foram classificados de acordo com Stern (2004) e o padrão de deposição de cera epicuticular está de acordo com a terminologia proposta por Barthlott et al. (1998).

Para as análises em MEV, flores das espécies analisadas foram desidratadas em série alcoólica e posteriormente submetidas ao ponto crítico com CO<sub>2</sub> líquido, fixadas em stubs e metalizadas com ouro utilizando-se o metalizador Bal-tec SCD 050. As análises das amostras e o registro foram realizados com o microscópio eletrônico de varredura JEOL LSM – 6360.

### 4.3 Resultados

**Morfologia floral** - As flores de *A. atropurpurea* são vinosas (Fig. 1A), as flores de *A. crepiniana* podem ser verdes, rosadas ou castanhas pontilhadas de vinoso (Fig. 1B), *A. hatschbachii* possui flores verdes ou castanhas com pontos vinosos (Fig. 1D), *A. mantiquyrana* apresenta flores amarelas com estrias vinosas (Fig. 1E), as flores de *A. gracilisepala* são róseas pontilhadas de vinoso (Fig. 1F) e *A. octophrys* possui flores vinosas e labelo esverdeado com dois pontos vinosos no ápice (Fig. 1G). As sépalas de *A. gracilisepala* (Fig. 1F) e das espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* são eretas (Figs. 1A, 1D, 1E), com exceção de *A. crepiniana* que junto com *A. octophrys* apresentam sépalas subpatentes (Fig. 1B, 1G). Nas espécies analisadas, as sépalas dorsais são totalmente livres das sépalas laterais, exceto em *A. atropurpurea* cujas sépalas são parcialmente coalescentes (Fig. 1A).

**Micromorfologia e anatomia das pétalas e sépalas** - Nos representantes de *A. seção Pleurobotryae* as pétalas são oblanceoladas com bordo inteiro, exceto *A. mantiquyrana* que apresenta pétalas lineares com bordo serrado (Fig. 1A), em *A. gracilisepala* as pétalas são deltóides com bordo serrado (Fig. 2B) e em *A. octophrys* são deltóides com bordo inteiro. Em vista frontal as pétalas são glabras formadas por células oblongas e isodiamétricas, exceto em *A. atropurpurea* e *A. hatschbachii* cujas pétalas apresentaram regiões papilosas (Fig. 1C). Todas as espécies analisadas apresentaram pétalas reduzidas, com mesofilo homogêneo e um feixe vascular colateral (Fig. 1D).

Em vista frontal as sépalas apresentam células epidérmicas oblongas, isodiamétricas ou poligonais. Em representantes de *A. seção Pleurobotryae* foram identificadas papilas simples, papilas cônicas e papilas com ápice aciculado (Fig. 2E), além destes três tipos de papilas, *A. gracilisepala* apresentou tricomas clavados (Fig. 2F) e *A. octophrys* tricomas alongados com ápice arredondado (Fig. 2G). A cutícula é lisa, sem poros ou rupturas nas sépalas de todas as espécies analisadas (Figs. 2E, 2F, 2G). Cera em plaquetas foi observada nas sépalas de *A. hatschbachii* e *A. gracilisepala* (Fig. 2F). Os estômatos estão presentes no ápice das sépalas dorsais e laterais de todas as espécies (Fig. 2E), exceto na sépala dorsal de *A. atropurpurea*. Em *A. atropurpurea* e *A. octophrys* as sépalas são hipoestomáticas, em *A. crepiniana*, *A. mantiquyrana* e *A. gracilisepala* as sépalas são anfiestomáticas e em *A. hatschbachii* as sépalas são epiestomáticas.

Em secção transversal, a epiderme das sépalas de todas as espécies analisadas é uniestratificada e papilosa nas duas faces, exceto em *A. hatschbachii* que apresenta face abaxial formada por células com paredes periclinais reta (Fig. 2H). Em todas as espécies analisadas grande parte das células epidérmicas apresenta vacúolo evidente e núcleo grande (Fig. 2H, 2I). O mesofilo é homogêneo, formado por células grandes e vacuoladas (Fig. 2H). Três feixes vasculares colaterais e idioblastos com ráfides estão presentes nas sépalas de todas as espécies estudadas. Com os testes histoquímicos realizados nas flores frescas, foi possível observar que em *A. crepiniana* o bordo das sépalas dorsais e grande parte do labelo reagiram ao vermelho neutro (Figs. 1C).

**Micromorfologia e anatomia do labelo** - O labelo das espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* e de *A. octophrys* é unguiculado, apresentando base estreita e alongada (Figs. 3A, 3B, 3D). Labelo inteiro está presente na maioria das espécies de *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 3A), com exceção de *A. crepiniana* que apresenta labelo trilobado assim como as outras espécies analisadas (Fig. 3B, 3C, 3D). O bordo é serreado e o ápice é arredondado em todas as espécies de *A. seção Pleurobotryae* (Fig. 3A e 3B), em *A. gracilisepala* o bordo é serreado e o ápice é agudo (Fig. 3C) e *A. octophrys* apresenta labelo com bordo ciliado e ápice retuso (Fig. 3D). Em *A. atropurpurea*, *A. hatschbachii* e *A. mantiquyrana* dois calos estão posicionados no terço superior do labelo (Fig. 3A), em *A. crepiniana* e *A. gracilisepala* os calos estão posicionados no terço médio (Fig. 3B, 3C). O labelo de *A. crepiniana* e de *A. mantiquyrana* apresentou um sulco na região central (Fig. 3B).

Em vista frontal, o labelo das espécies analisadas apresenta superfície adaxial papilosa, exceto em *A. octophrys* cuja superfície é pubescente (Fig. 3D). Na maior parte das espécies de *A. seção Pleurobotryae* e em *A. gracilisepala*, as células epidérmicas são oblongas e poligonais, em *A. atropurpurea* e em *A. octophrys* as células epidérmicas são oblongas e isodiamétricas. Papilas simples estão presentes no labelo de *A. crepiniana*, *A. hatschbachii*, *A. mantiquyrana* e *A. gracilisepala* (Fig. 3E), *A. atropurpurea* apresenta papilas simples e papilas imbricadas (Fig. 3F) e *A. octophrys* apresenta papilas simples, papilas cônicas (Fig. 3G), tricomas com ápice arredondado (Fig. 3H) e tricomas com ápice bifurcado (Fig. 3I).

Em relação à ornamentação da cutícula, *A. gracilisepala* apresentou estrias irregulares em toda a extensão do labelo (Fig. 3E), *A. atropurpurea* apresentou estrias longitudinais nos calos e cutícula reticulada no restante do labelo (Fig. 4F), *A. crepiniana* apresentou cutícula lisa na base, reticulada no ápice e estrias longitudinais nas demais regiões (Fig. 3J), em *A. hatschbachii* a cutícula é lisa na base e nas outras regiões apresenta estrias irregulares, em *A. mantiquyrana* a cutícula é lisa com prolongamentos entre as células adjacentes em toda a extensão do labelo (Fig. 3K), *A. octophrys* apresenta regiões com cutícula lisa (Fig. 3I), estrias irregulares, estrias longitudinais e poros (Fig. 3H).

Em secção transversal, a epiderme do labelo é uniestratificada e papilosa nas duas faces (Fig. 4B, 4D, 4G). Nas espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae*, a região secretora da base do labelo (Fig. 5A) apresentou células epidérmicas e subepidérmicas com núcleo grande e citoplasma denso, nesta região *A. hatschbachii* apresentou três camadas de células subepidérmicas (Fig. 4B), as demais espécies da seção apresentaram uma camada. Em secção longitudinal a base do labelo das espécies pertencentes a *A. seção Pleurobotryae* apresenta uma protuberância (Fig. 4C) que quando vista em secção transversal, forma uma cavidade com epitélio secretor (Fig. 4C, detalhe). Em *A. hatschbachii* a região entre os calos (Fig. 4A) apresentou epiderme formada por células com citoplasma denso (Fig. 4D). Cutícula distendida foi observada nas regiões secretoras da base do labelo nas espécies de *A. seção Pleurobotryae* e no sulco central de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* (Fig. 4E). Em *A. mantiquyrana* e *A. crepiniana*, o sulco localizado no centro do labelo (Fig. 4F) apresenta em toda a sua extensão, células epidérmicas e subepidérmicas com núcleo grande e citoplasma denso e secreção sobre a

epiderme (Fig. 4G). Nas demais regiões do labelo das espécies de *A. seção Pleurobotryae* e em toda a extensão do labelo de *A. gracilisepala* e *A. octophrys* as células epidérmicas apresentaram vacúolo grande e núcleo evidente, sem a presença de secreção e de camadas subepidérmicas diferenciadas do restante do mesofilo (Figs. 4H – 4K).

Em todas as espécies analisadas, o mesofilo é homogêneo com poucos espaços intercelulares e três feixes vasculares colaterais (Figs. 4H, 4J). Idioblastos com ráfides foram observados no mesofilo das espécies analisadas (Fig. 4K).

Os testes histoquímicos realizados com flores frescas, indicaram que algumas regiões do labelo de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* coraram-se ao vermelho neutro (Figs. 5B, 5E) e ao vermelho de rutênio (Figs. 5C, 5F). Com os testes histoquímicos aplicados nos cortes histológicos foi possível observar que em todas as espécies de *A. seção Pleurobotryae* as células epidérmicas da base do labelo (Fig. 5G), da região entre os calos de *A. hatschbachii* e do sulco central de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana*, coram-se ao vermelho de rutênio (Fig. 5H). As demais regiões do labelo destas espécies reagem ao vermelho neutro (Fig. 5I) e em *A. gracilisepala* e *A. octophrys* as células epidérmicas apresentaram reação positiva apenas ao vermelho neutro (Fig. 5J, 5K). Em todas as espécies analisadas o mesofilo apresenta grãos de amido (Fig. 5L).

#### 4.4 Discussão

A anatomia floral e as análises histoquímicas realizadas nas flores de *Acianthera*, mostraram que apenas as quatro espécies atualmente aceitas para *A. seção Pleurobotryae* possuem possíveis nectários na base do labelo e que o labelo de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* apresenta sulco central que apresenta características de tecidos secretores. Locais envolvidos na possível emissão de odores (osmóforos) foram observados nas sépalas e no labelo dos representantes de *A. seção Pleurobotryae* e em *A. gracilisepala* e *A. octophrys*, pertencentes a outras seções do gênero.

Nas orquídeas, a principal recompensa oferecida aos polinizadores é o néctar (Dressler 1993) e os nectários são os locais que produzem e oferecem substâncias líquidas envolvidas nas interações das plantas com seus polinizadores, podendo apresentar variações em sua anatomia, morfologia e localização no corpo da planta (Pacini et al. 2003).

Tecidos secretores com características de nectários foram localizados na base do labelo das quatro espécies de *A.* seção *Pleurobotryae*, no sulco central do labelo de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* e na região entre os calos de *A. hatschbachii*. Nas espécies de *A.* seção *Pleurobotryae*, as células nectaríferas apresentaram núcleo grande, vacúolo pequeno e citoplasma denso, nestas regiões a presença de secreção mucilaginosa sobre as células epidérmicas foi registrada pela reação ao vermelho de rutênio. Os nectários consistem em uma epiderme, com ou sem tricomas, associada a um parênquima especializado, e as células envolvidas no processo de secreção geralmente são caracterizadas pela presença de paredes finas, vacúolos pequenos, citoplasma denso contendo grande quantidade de mitocôndrias e núcleo relativamente grande (Fahn 2000, Leitão et al. 2014). Nas espécies analisadas, as regiões caracterizadas como possíveis locais de secreção de néctar apresentaram epiderme formada por células epidérmicas papilosas, sem a presença de tricomas secretores.

Nectários superficiais foram observados no labelo das espécies analisadas, exceto em *A. gracilisepala* e *A. octophrys*. A presença destas estruturas secretoras foi observada em espécies miofílicas de *Acianthera* (Borba e Semir 2001, Melo et al., 2010) e em outros representantes de Pleurothallidinae (Barbosa et al 2009; Cardoso 2014; Duque-Buitrago et al. 2014). A presença sulco central secretor no labelo de *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana*, foi comprovada neste estudo pelos testes histoquímicos aplicados e também tem sido registrada em espécies de *Bulbophyllum* por Davies e Stpiczynska (2014) e Stpiczynska et al. (2015). Em representantes de *Acianthera*, os nectários localizados na base do labelo foram observados em *A. teres* e *A. ochreatea* ambas polinizadas por moscas Phoridae (Borba e Semir 2001) e podem ser importantes para o processo de polinização, pois mantêm o polinizador dentro da flor por mais tempo (Teixeira et al. 2004). No entanto, como a produção de néctar é um processo com grande demanda energética (Pacini et al. 2003), algumas espécies podem ter perdido a capacidade de produção de néctar. Em suas análises, Cardoso (2014) constatou que apenas as espécies mais basais apresentaram nectários, enquanto as espécies mais derivadas apresentaram apenas osmóforos, estes resultados permitiram a esta autora hipotetizar que houve a perda da capacidade de produção de néctar pelas espécies mais derivadas. Neste sentido, estudos anatômicos e filogenéticos em mais representantes de *Acianthera* são

importantes para a compreensão da evolução dos caracteres florais e dos processos de polinização em representantes do gênero.

Os nectários localizados no labelo dos representantes de *A. seção Pleurobotryae* são desprovidos de estômatos, tricomas ou células modificadas que atuam na secreção do néctar (Fahn 2000; Pacini et al. 2003), assim, a secreção nestas regiões pode ser caracterizada como granulócrica como previamente registrado para outras espécies do gênero (Melo et al, 2010) e para outros representantes de Orchidaceae (Stpiczynska 1997; Stpiczynska et al. 2005; Cardoso 2014). A distensão da cutícula na região secretora, como observada em algumas regiões, pode indicar que o néctar é liberado atravessando a membrana plasmática e a parede celular e acumulando-se entre a parede celular e a cutícula, ocasionando o rompimento da cutícula e sua consequente liberação (Pacini et al. 2003). No entanto, estudos ultraestruturais são necessários para esclarecer os mecanismos celulares envolvidos neste processo nas espécies analisadas.

As flores de espécies polinizadas por Diptera, como é o caso dos representantes de Pleurothallidinae, podem emitir odores geralmente desagradáveis a humanos (Woodcock et al. 2014), estes odores agem na atração dos polinizadores e são muito importantes para a ecologia da polinização de muitas espécies de orquídeas (Stipczynska 1993). Em *Acianthera*, a emissão de odores nas sépalas foi registrada em *A. luteola* (Singer e Cocucci 1999) e *A. prolifera* (Melo et al 2010), em *A. fenestrata* e *A. aphtosa* os osmóforos estão presentes nas sépalas e em algumas regiões do labelo (Cardoso 2014). Todas as espécies analisadas apresentaram células epidérmicas papilosas ou tricomas com características de osmóforos no ápice das sépalas e em algumas regiões do labelo, principalmente na região apical. Os osmóforos podem se apresentar como regiões papilosas, como tricomas unicelulares ou como elevações na superfície das peças florais (Pridgeon e Stern 1983; Stern et al. 1987; Cardoso 2014) e durante a antese as células envolvidas na produção de fragrâncias geralmente apresentam núcleo evidente, vacúolo grande e citoplasma periférico (Pridgeon e Stern 1983, 1985; Stern et al. 1987).

A emissão dos compostos voláteis produzidos nos osmóforos de Pleurothallidinae pode ocorrer por difusão cuticular (Pridgeon e Stern 1983, 1985) ou por meio de poros estomáticos localizados no ápice das sépalas (Melo et al. 2010). Poros estomáticos estão presentes nas sépalas de todas as espécies analisadas e podem estar relacionados ao processo de liberação de odores nestas regiões (Melo

et al. 2010). Nos labelos das espécies analisadas, não foram observados poros estomáticos, porém, a cutícula das regiões possivelmente envolvidas na produção de fragrâncias, apresentou diferentes tipos de ornamentações, além de poros e rupturas por onde pode acontecer a possível liberação de fragrâncias.

Nas regiões secretoras das sépalas e labelo das espécies analisadas, não foram observadas ramificações dos feixes vasculares, embora grande quantidade de amido tenha sido registrada no tecido fundamental. Os nectários registrados em outros representantes de *Acianthera* também não são vascularizados, mas a grande quantidade de amido presente nestas regiões pode ser usada como fonte de energia para os processos secretores desempenhados por estes tecidos (Melo et al., 2010). A relação entre o acúmulo de amido em nectários e osmóforos tem sido registrada para outras espécies de Orchidaceae (Stern et al. 1987, Stpiczynska 1993, 1997; Davies et al. 2005).

A presença de possíveis regiões produtoras de néctar no labelo das quatro espécies de *A. seção Pleurobotryae*, é uma característica floral compartilhada entre os representantes desta seção, uma vez que *A. gracilisepala* e *A. octophrys* não apresentaram regiões com características de nectários. Por outro lado, tanto as espécies pertencentes à *A. seção Pleurobotryae* como as demais espécies analisadas, apresentaram osmóforos nas sépalas e no labelo. Assim, pode-se sugerir que nas espécies de *A. seção Pleurobotryae* os polinizadores são atraídos pelos odores emitidos pelas flores e o néctar é oferecido como recompensa floral aos visitantes, enquanto que *A. gracilisepala* e *A. octophrys* podem atrair seus polinizadores pela emissão de odores, mas não oferecem recompensa floral aos visitantes.

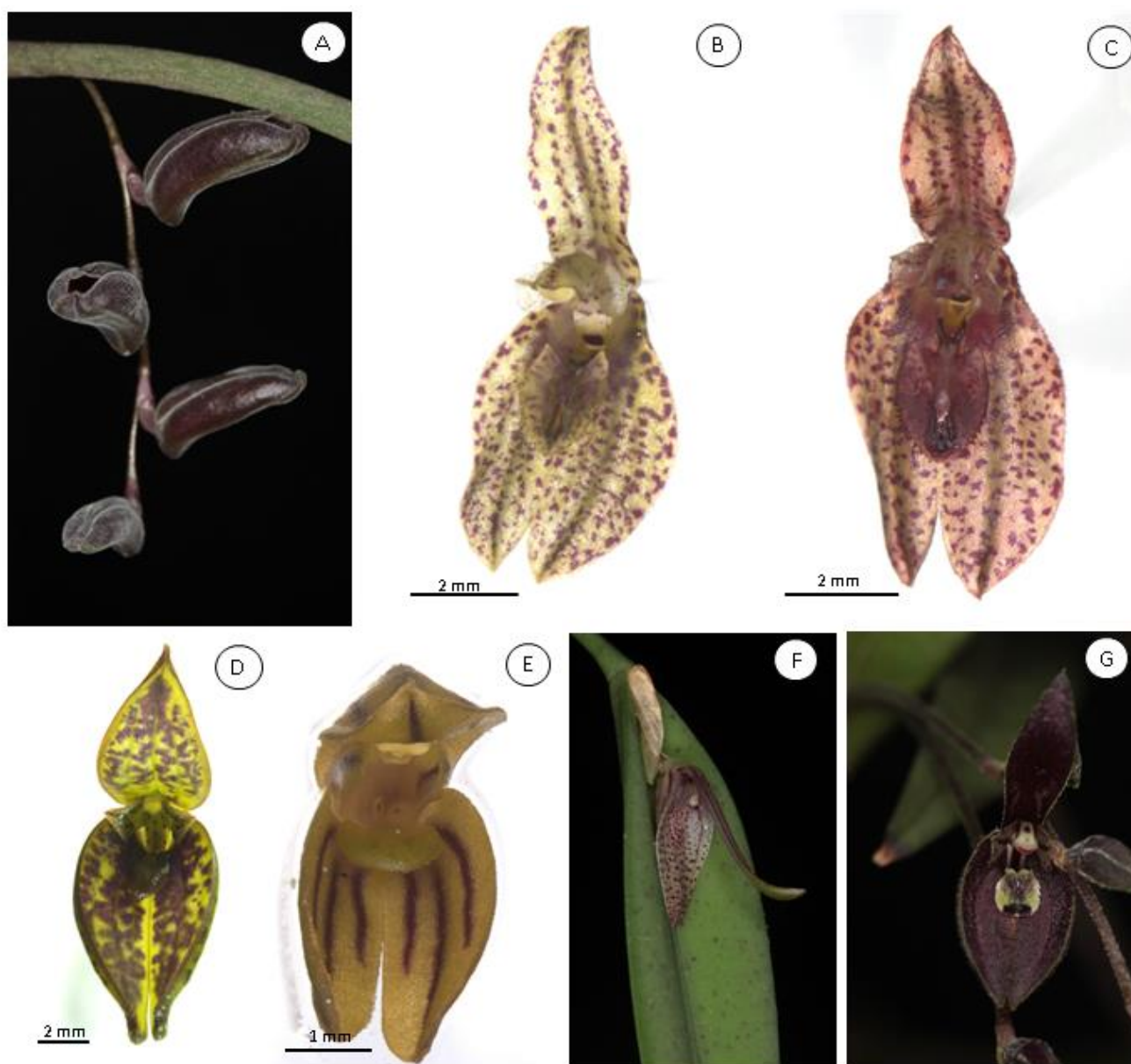
#### 4.5 Referências

- Barros F, Vinhos F, Rodrigues VT, Barberena FFVA, Fraga CN, Pessoa EM, Forster W, Menini Neto L, Furtado SG, Nardy C, Azevedo CO, Guimarães LRS (2015) Orchidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10986>>
- Barthlott W, Neinhuis C, Cutler D, Ditsch F, Meusel I, Theisen I, Wilhelmi H (1998) Classification and terminology of plant epicuticular waxes. Botanical Journal of the Linnean Society 126(3): 237-260
- Borba EL, Semir J (2001) Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. Annals of Botany 88(1): 75-88

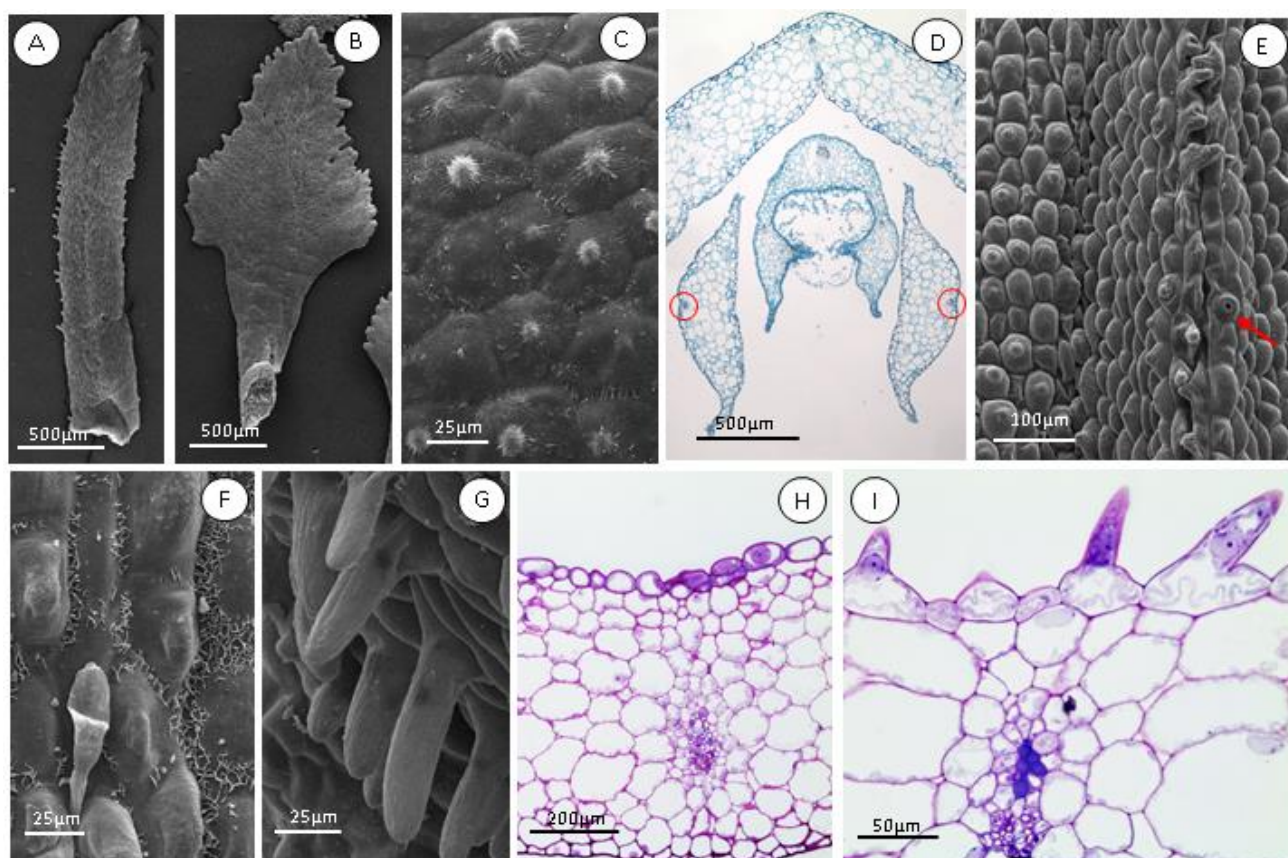
- Barbosa RA, Melo MC, Borba EL (2009) Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematic and Evolution* 283(1-2): 1-8
- Cardoso PR (2014) Desenvolvimento floral em espécies de Pleurothallidinae (Orchidaceae) com ênfase nas estruturas secretoras. *Tese de doutorado*, São Paulo
- Chiron GR, van den Berg C (2012) Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Richardiana* 12(2): 59-77
- Davies KL, Stpiczynska M, Gregg A (2005) Nectar-secreting floral stomata in *Maxillariaanceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 96(2): 217-227
- Davies LK, Stpiczyn'ska M (2014) Labellar anatomy and secretion in *BulbophyllumThouars* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sect. *Racemosae*Benth. & Hook. f. *Annals of Botany* 114: 889-911
- Dressler RL (1993) Phylogeny and classification of the orchid family. Cambridge University Press
- Duque-Buitrago CA, Alzate-Quintero NF, Otero T (2014) Nocturnal pollination by Fungus gnats of the Colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana* 13(3): 407-417
- Fahn A (2000) Structure and function of secretory cells. *Advances in Botanical Research*, 31: 37-75
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 27(2): 137-138
- Karremans AP (2016) Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. *Lankesteriana* 16(2): 219-241
- Leitão CAE, Dolder MAH, Cortelazzo A L. 2014. Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). *Flora* 209: 233-243
- Luque RL, Sousa HC, Kraus JE (1996) Métodos de coloração de Roeser (1972)-modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de Alcão 8GS ou 8GX. *Acta Botanica Brasilica* 10(2): 199-212
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS (2010) Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematic and Evolution* 286(3-4): 141-151
- Pacini E, Nepi M, Vesprini JL (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematic and Evolution* 238(1-4): 7-21
- Pridgeon AM, Stern WL (1983) Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 70(8): 1233-1243
- Pridgeon AM, Stern WL (1985) Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). *Botanical Gazette* 146(1): 115-123
- Pridgeon AM, Chase MW (2001) A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). *Lindleyana* 16(4): 235-271
- Pridgeon, AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. (eds.) (2005) *Genera Orchidacearum*, volume 4. Oxford University Press, New York
- Rodrigues VT, Smidt EC, Barros F (2015) Revisão taxonômica de *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). *Hoehnea* 42(4): 615-627



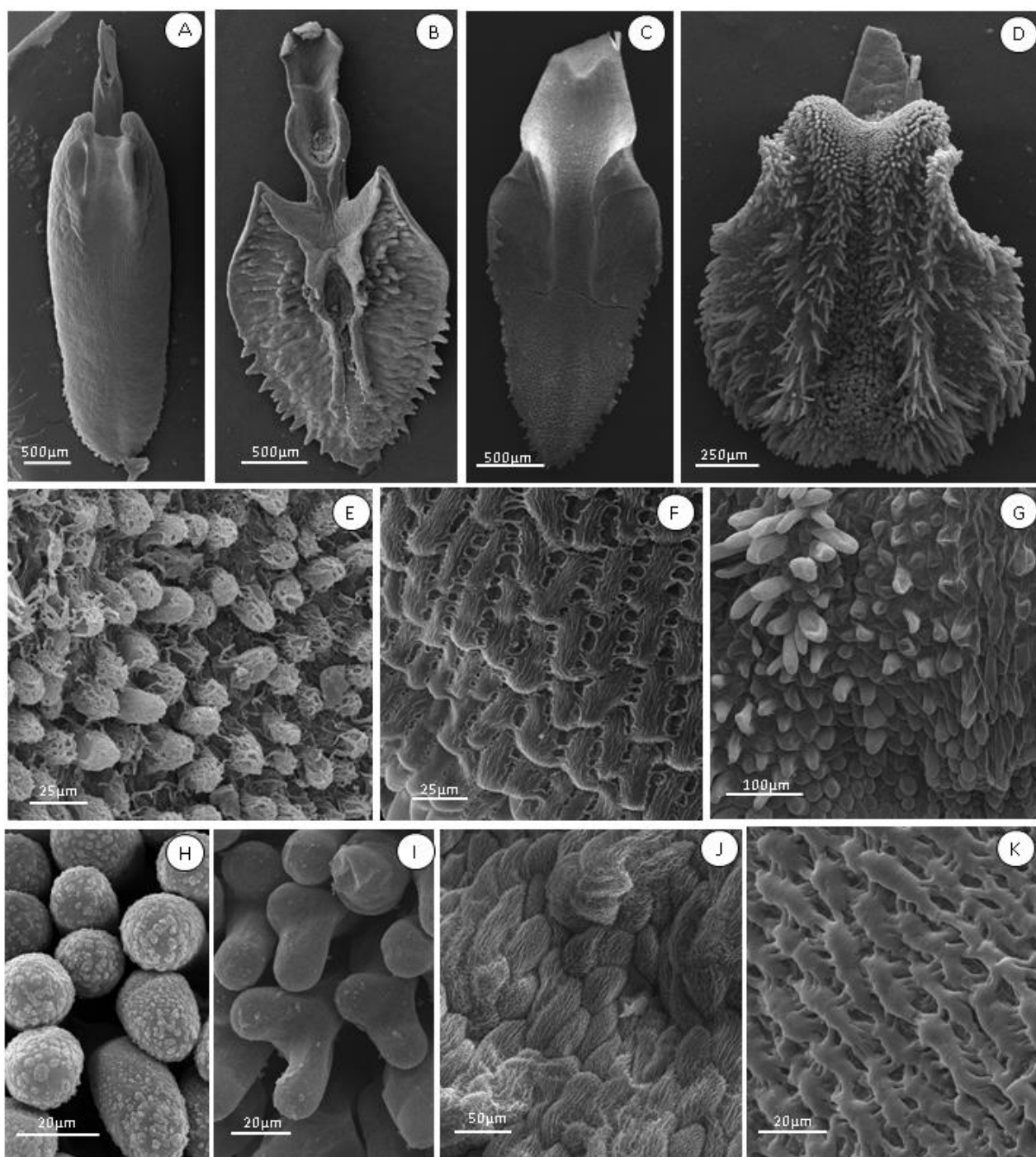
- Rodrigues VT, Smidt EC, Bolson M, Barros F. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. Brazilian Journal of Botany. No prelo.
- Singer RB, Cocucci AA (1999) Pollination mechanism in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. Lindleyana 14(1):47-56
- Singer RB (2003) Orchid pollination: recent developments from Brazil. Lankesteriana, 7: 111-114
- Stern WL, Curry KJ, Pridgeon AM (1987) Osmophores of Stanhopea (Orchidaceae). American Journal of Botany 74:1323-1331
- Stern WT 2004. Botanical Latin. Timber Press, Portland. 546p.
- Stpiczynska M (1993) Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidiumtracyanum* Rolfe (Orchidaceae). Acta SocietatisBotanicorum Poloniae 62(1-2): 5-9
- Stpiczynska M (1997) The structure of nectar of *Platantherabifolia* L. Orchidaceae. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 66(1): 5-11
- Stpiczynska M, Davies KL, Gregg A (2005) Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). Annals of Botany 95(5): 749-756
- Stpiczynska M.; Davies KL, Kaminska M (2011) Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae). Annals of Botany. 107: 327-345
- Stpiczynska M, Davies KL, Kaminska M (2015) Diverse labellar secretions in African *Bulbophyllum* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sections *Ptiloglossum*, *Oreonastes* and *Megaclinium*. Botanical Journal of the Linnean Society 179(2): 266–287
- Teixeira SP, Borba EL, Semir J (2004) Lip Anatomy and its Implications for the Pollination Mechanisms of *Bulbophyllum* Species (Orchidaceae). Annals of Botany 93(5): 499-505
- Vogel S (1962) Duftdrüsen im Dienst der Bestäubung über Bau und Funktion der Osmophoren. Akad. Wiss. Abh. Math.-Naturwiss. Kl. 10: 598-763
- Woodcock T, Larson BMH, Kevan PG, Inouye DW, Lunau K (2014) Flies and flowers II: floral attractants and rewards. Journal of Pollination Ecology 12(8): 63-94



**Fig. 1.** Flores de espécies de *Acianthera* analisadas. **A** flores de *A. atropurpurea*. **B** Flor de *A. crepiniana* apresentando coloração natural. **C** Flor de *A. crepiniana* após a imersão em solução de vermelho neutro. **D** Flor de *A. hatschbachii*. **E** Flor de *A. mantiquyrana*. **F** Flor de *A. gracilisepala*. **G** Flor de *A. octophrys*.

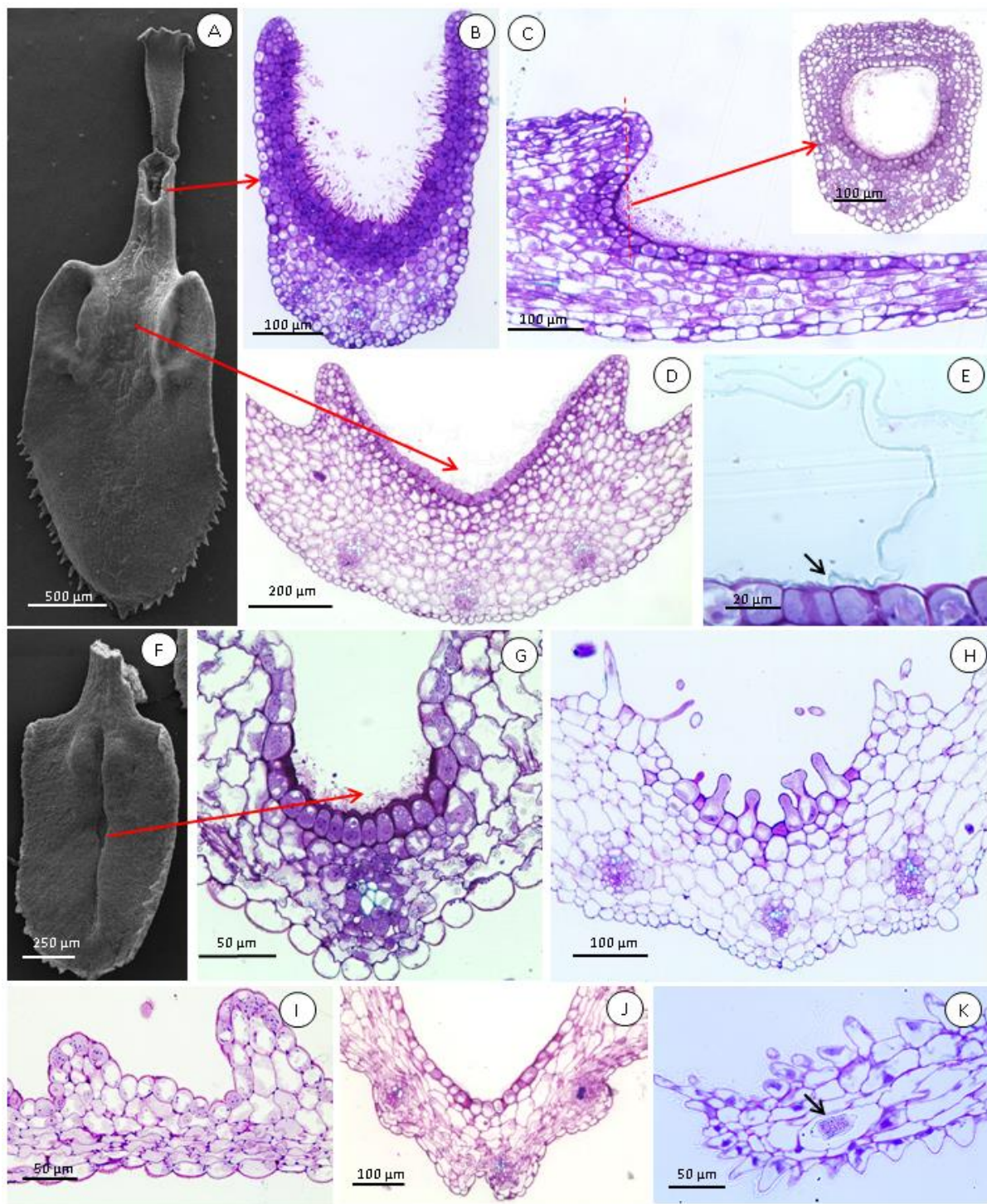


**Fig. 2.** Aspectos anatômicos e micromorfológicos das pétalas e sépalas de *Acianthera*. **A** Pétala linear de *A. mantiquyrana*. **B** Pétala deltóide de *A. gracilisepala*. **C** Papilas presentes nas pétalas de *A. atropurpurea*. **D** Pétalas de *A. hatschbachii* vistas em microscopia de luz, destacando-se os feixes vasculares. **E** Vista frontal da sépala de *A. crepiniana* com papilas simples, papilas cônicas, papilas com ápice aciculado e poro estomático (seta). **F** Tricoma clavado presente nas sépalas de *A. gracilisepala* e cera em forma de plaquetas. **G** Tricomas com ápice arredondado presentes nas sépalas de *A. octophrys*. **H** Sépala de *A. hatschbachii* vista em microscopia de luz, com mesofilo homogêneo e feixe vascular colateral. **I** Sépala de *A. atropurpurea* com epiderme papilosa apresentando papilas com ápice aciculado na epiderme adaxial e feixe vascular colateral no mesofilo.

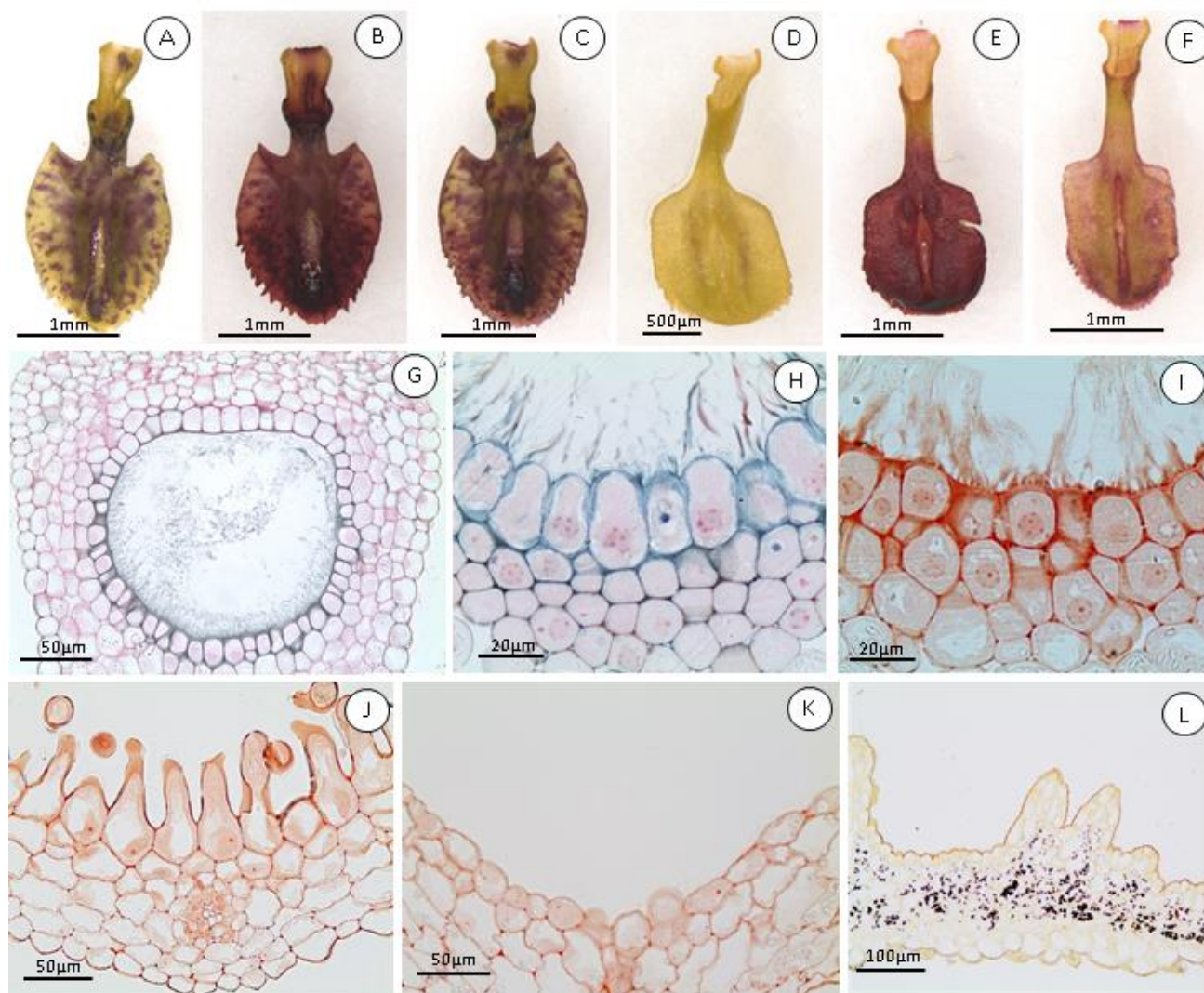


**Fig. 3.** Aspectos micromorfológicos do labelo de *Acianthera*. **A** *A. hatschbachii*. **B** *A. crepiniana*. **C** *A. gracilisepala*. **D** *A. octophrys*. **E** Células papilosas e cutícula com estrias irregulares em *A. gracilisepala*. **F** Papilas imbricadas e cutícula reticulada em *A. atropurpurea*. **G** Papilas simples e papilas cônicas em *A. octophrys*. **H** Tricomas com ápice arredondado de *A. octophrys*. **I** Tricomas bifurcados em *A. octophrys*. **J** Estrias longitudinais em *A. crepiniana*. **K** cutícula com prolongamentos laterais em *A. mantiquyrana*.





**Fig. 4.** Aspectos gerais e anatômicos do labelo de *Acianthera*. **A** visão geral do labelo de *A. hatschbachii* em MEV. **B** Secção transversal da base do labelo de *A. hatschbachii* com epiderme secretora. **C** Secção longitudinal da base do labelo de *A. mantiquyrana*, no detalhe, secção transversal da região destacada formando uma cavidade secretora. **D** Secção transversal da região entre os calos em *A. hatschbachii*. **E** Cutícula distendida em *A. hatschbachii* (seta). **F** Visão geral do labelo de *A. mantiquyrana* em MEV. **G** Região secretora no sulco central de *A. mantiquyrana*. **H** Região central de *A. octophrys* com diferentes tipos de tricomas em secção transversal. **I** Secção longitudinal do ápice do labelo de *A. crepiniana*. **J** Região entre os calos do labelo de *A. atropurpurea*. **K** Ápice do labelo de *A. gracilisepala* com papila e idioblasto com ráfide no mesofilo (seta).



**Fig. 5.** Testes histoquímicos aplicados no labelo das espécies de *Acianthera* analisadas. **A** Labelo de *A. crepiniana* sem aplicação de testes histoquímicos. **B** Labelo de *A. crepiniana* após a reação com vermelho neutro. **C** Labelo de *A. crepiniana* após a reação com vermelho de rutênio. **D** Labelo de *A. mantiquyrana* sem a aplicação de testes histoquímicos. **E** Labelo de *A. mantiquyrana* após a reação com vermelho neutro. **F** Labelo de *A. mantiquyrana* após a reação com vermelho de rutênio. **G** Células da região secretora da base do labelo de *A. mantiquyrana* após a reação ao vermelho de rutênio. **H** Células da região entre os calos no labelo de *A. hatschbachii* após a reação ao vermelho de rutênio. **I** Reação ao vermelho neutro das células epidérmicas e subepidérmicas de *A. crepiniana*. **J** Tricomas de *A. octophrys* após a reação com vermelho neutro. **K** Região entre os calos em *A. gracilisejala* após a reação com vermelho neutro. **L** Secção longitudinal de *A. crepiniana* com amido no mesofilo.

**Tabela 1.** Lista das espécies de *Acianthera* analisadas

<b>Táxon</b>	<b>Seção</b>	<b>Voucher</b>
<i>A. octophrys</i> (Rchb. f.) Pridgeon & M. W. Chase	<i>Tomentosae</i>	Toscano de Brito, A. L. V. 3410 UPCB
<i>A. atropurpurea</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 020 HUCP
<i>A. hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 03 HUCP
<i>A. hatschbachii</i> (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Kersten, R. A. HUCP 18411
<i>A. crepiniana</i> (Cogn.) Chiron & van den Berg	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 05 HUCP
<i>A. mantiquyrana</i> (Barb. Rodr.) V. T. Rodrigues & F. Barros	<i>Pleurobotryae</i>	Almeida, A.B.R. 02 HUCP
<i>A. gracilisepala</i> (Brade) Luer	<i>Acianthera</i>	Almeida, A.B.R. 01 HUCP



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo foram encontrados caracteres anatômicos, que em conjunto, representam caracteres sinapomórficos das quatro espécies pertencentes à *Acianthera* seção *Pleurobotryae*, como a presença de folhas unifaciais circulares ou elípticas em secção transversal, folhas circulares com feixes vasculares organizados em círculos concêntricos, mesofilo formado por 28 a 30 camadas de células, além de caracteres homoplásicos que em conjunto são exclusivos dos representantes da seção, como a presença de três camadas corticais esclerificadas no ramicaule, a ausência de idioblastos traqueoidais no mesofilo e labelo com ápice arredondado. Os caracteres vegetativos apresentaram menor índice de homoplasias, confirmando que estes são mais conservativos que os caracteres micromorfológicos florais e podem ser úteis para inferir relações filogenéticas em níveis internos de *Acianthera*.

Dada a quantidade de caracteres anatômicos vegetativos úteis para a delimitação de *A. seção Pleurobotryae*, a combinação dos dados anatômicos aos dados moleculares mostrou-se de grande utilidade para este estudo. Assim, é urgente a necessidade de estudos moleculares com o maior número possível de representantes do gênero. Isto permite que mais estudos anatômicos e morfológicos abrangendo mais espécies das outras seções de *Acianthera* possam ser realizados, facilitando a identificação e reconhecimento dos representantes das seções as quais o gênero está subdividido.

O estudo do desenvolvimento dos tricomas radiculares possibilitou a constatação de que os tricomas radiculares espiralados são a última fase de desenvolvimento dos tricomas radiculares presentes em *Acianthera*, além disso, as análises histoquímicas esclareceram a função desempenhada por estas estruturas.

Em *Pleurothallidinae* e principalmente em *Acianthera*, os estudos anatômicos de desenvolvimento são escassos, mas são importantes para esclarecer a origem e a organização dos tecidos e estruturas. Estudos ontogenéticos do ramicaule de *Acianthera* podem esclarecer o surgimento do parênquima aerífero observado em grande parte das espécies analisadas aqui e até então não citado para o gênero. Ao registrar a presença de cicatrizes de tricomas na epiderme foliar observa-se a necessidade de estudos anatômicos e ontogenéticos das folhas de *Acianthera* para esclarecer a origem e função destas estruturas. Assim, a anatomia aliada aos



estudos de desenvolvimento mostra-se um campo de pesquisa pouco explorado, mas promissor.

Neste estudo constatou-se que as quatro espécies atualmente aceitas para *A. seção Pleurobotryae* apresentaram nectários na base do labelo e que *A. crepiniana* e *A. mantiquyrana* apresentaram tecido secretores também na fenda presente na região central do labelo. Os osmóforos foram observados nas sépalas e no labelo das seis espécies usadas para o estudo de anatomia floral. Em Orchidaceae, a presença de nectários e osmóforos está relacionada à atração de polinizadores, assim, estudos de anatomia floral e de *Acianthera* podem facilitar a interpretação da história evolutiva das espécies.

Estudos de anatomia floral em *Acianthera* são restritos a algumas espécies do gênero. A identificação de glândulas e tecidos secretores em mais espécies de *Acianthera* pode ajudar a compreender os mecanismos envolvidos na polinização destas espécies que apresentam alta taxa de endemismo no território brasileiro. Assim, observa-se grande necessidade de estudos anatômicos florais entre os representantes de Pleurothallidinae de modo geral, uma vez que estas espécies representam um dos maiores grupos de Orchidaceae polinizados por Diptera e podem apresentar grande diversidade de mecanismos de atração aos polinizadores.

## 6 REFERÊNCIAS FINAIS

- BADALAMENTI, F.; ALAGNA, A.; FICI, S. Evidences of adaptive traits to rocky substrates undermine paradigm of habitat preference of the Mediterranean seagrass *Posidonia oceanic*. **Scientific Reports**, n.5, 08804. 2015
- BARROS, F.; VINHOS, F.; RODRIGUES, V. T.; BARBERENA, F. F. V. A.; FRAGA, C. N.; PESSOA, E. M.; FORSTER, W.; MENINI NETO L.; FURTADO S. G.; NARDY C.; AZEVEDO C. O.; GUIMARÃES L. R. S. Orchidaceae in: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. 2015 Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10986>> Acesso em 20/11/2016.
- BARBOSA, R. A.; MELO, M. C.; BORBA, E. L. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. **Plant Systematic and Evolution** 283(1-2): 1-8, 2009.
- BARTHOLOTT, W.; NEINHUIS, C.; CUTLER, D.; DITSCH, F.; MEUSEL, I.; THEISEN, I.; WILHELMI, H. Classification and terminology of plant epicuticular waxes. **Botanical Journal of the Linnean Society** 126(3): 237-260, 1998.
- BENZING, D. H.; FRIEDMAN, W. E.; PETERSON, G.; RENFROW, A. Shootlessness, velamentous roots, and the pre-eminence of Orchidaceae in the epiphytic biotope. **American Journal of Botany**, 70(1): 121-133. 1983.

- BERNAL, A. A.; SMIDT, E. C.; BONA, C. Spiral root hairs in Spiranthinae (Cranichideae: Orchidaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 38(2): 411-415. 2015.
- BORBA, E. L.; SEMIR, J. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. **Annals of Botany** 88(1): 75-88, 2001.
- BORBA, E. L.; SHEPHERD, G. J.; VAN DEN BERG, C.; SEMIR, J. Floral and vegetative morphometrics of five *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: Correlation with taxonomy, phylogeny, genetic variability and pollination systems. **Annals of Botany** 90: 219-230, 2002.
- BENZING, D. H.; PRIDGEON, A. M. Foliar trichomes of *Pleurothallidinae* (Orchidaceae): functional significance. **American Journal of Botany**, 70(2): 173-180, 1983.
- CARDOSO, P. R. **Desenvolvimento floral em espécies de *Pleurothallidinae* (Orchidaceae) com ênfase nas estruturas secretoras**. 212 f. Tese de doutorado (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica, São Paulo, 2014.
- CARLSWARD, B. S.; STERN, W. L.; BYTEBIER, B. Comparative vegetative anatomy and systematics of the angraecoids (Vandaeae, Orchidaceae) with an emphasis on the leafless habit. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 151(2): 165-218. 2006.
- CHASE, M. W.; FREUDENSTEIN, J. V.; CAMERON, K. M.; BARRETT, R. L. DNA data and Orchidaceae systematics: a new phylogenetic classification. In: DIXON, K.; KELL, S. P.; BARRETT, R. L and CRIBB, P. J. (Eds). **Orchid conservation**. Kota Kinabalu: Natural History Publications, p. 69-89, 2003.
- CHASE, M. W. Classification of Orchidaceae in the age of DNA data. **Curti's Botanical Magazine**. 22(1): 2-7, 2005.
- CHASE, M. W.; CAMERON, K. M.; FREUDENSTEIN, J. V.; PRIDGEON, A. M.; SALAZAR, G.; VAN DEN BERG, C.; SCHUITEMAN, A. An update classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2015, 177, 151-174, 2015.
- CHIRON, G. R.; GUIARD, J.; VAN DEN BERG, C. Phylogenetics relationships in Brazilian *Pleurothallis sensulato* (*Pleurothallidinae*, Orchidaceae): evidence from nuclear ITS rDNA sequences. **Phytotaxa** 46: 34-58, 2012.
- CHIRON, G. R.; VAN DEN BERG, C. Révision taxonomique du genre *Acianthera* (Orchidaceae, *Pleurothallidinae*). **Richardiana** 12: 59-77, 2012.
- CHOMICKI, G.; BIDEI, L. P. R.; JAY-ALLEMAND, C. Exodermis structure controls fungal invasion in the leafless epiphytic orchid *Dendrophylaxlindenii* (Lindl.) Benth. ex Rolfe. **Flora**, 209(2): 88-94. 2014.
- DAVIES, L. K.; TURNER, M. P. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 93(1): 75–86, 2004.
- DAVIES, K. L.; STPICZYNSKA, M.; GREGG, A. Nectar-secreting floral stomata in *Maxillariaanceps* Ames & C. Schweinf. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 96(2): 217-227. 2005.
- DAVIES, L. K.; STPICZYNSKA, M. Labellar micromorphology of *Bifrenariinae* Dressler (Orchidaceae). **Annals of Botany** 98(6): 1215–1231, 2006.
- DAVIES L. K.; STPICZYNSKA, M. Labellar anatomy and secretion in *BulbophyllumThouars* (Orchidaceae: *Bulbophyllinae*) sect. *Racemosae* Benth. & Hook. f. **Annals of Botany** 114: 889-911. 2014.

- DICKISON, W. C. **Integrative plant anatomy**. Academic Press. 2000.
- DRESSLER, R. L. Phylogeny and classification of the orchid family. Portland: **Dioscorides**, 314 p. 1993.
- DUQUE-BUITRAGO, C. A.; ALZATE-QUINTERO, N. F.; OTERO, T. Nocturnal pollination by Fungus gnats of the Colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **Lankesteriana** 13(3): 407-417, 2014.
- EVERT R. F. **Esau's plant anatomy**. 3rd ed. Wiley, New Jersey. 2006.
- FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in Botanical Research**, 31: 37-75. 2000.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies with a molecular clock. **Systematic Biology** 34(2): 152-161. 1985.
- FREUDENSTEIN, J.V.; CHASE, M. W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. **Annals of Botany** 115(4): 665-681. 2015.
- FORDE B.; LORENZO, H. The nutritional control of root development. **Plant and Soil**, 232(1): 51-68. 2001.
- FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. D. van Nostrand Company Inc., Princeton. 1949.
- FOSTER, A. S. Plant idioblasts: remarkable examples of cell specializations. **Protoplasma** 46(1):184-193. 1956.
- FITCH, W. M. Towards defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. **Systematic Biology** 20(4): 406-416. 1971.
- FRANKLIN, G.L. Preparation of thin sections of sintetic resins and wood-resin composites, and a new macerating method for wood. **Nature** 155 (3924), 51,945.
- GARAY, L. A. Notatio Orchidologica II. **Archivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro** 12: 169-186, 1952.
- GELMAN, A.; RUBIN, D. B. Inference from iterative simulation using multiple sequences. **Statistical Science** 7: 457-72. 1992.
- GILROY, S.; JONES, D. L. Through form to function: root hair development and nutrient uptake. **Trends in Plant Science**, 5(2): 56 – 60. 2000.
- GREGORY, M.; BAAS, P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotiledons. **Israel Journal of Botany**, 38(2-3): 125-174. 1989.
- GROOM, P. Botanical notes, n° 4 – On the velamen of orchids. **Annals of Botany**, 7(25): 143-151. 1893.
- HOEHNE, F. C. Orchidaceas dos Herbarios de Alexandre Curt Brade e do Museu Nacional. **Boletim do Museu Nacional** 12: 1-37, 1936.
- IAWA Committee. International Association of Wood Anatomists. **List of microscopic features for hardwood identification**. IAWA Bulletin 10(3): 219-332. 1989.
- IDRESS, A.; GEHANI, A.; ISMAIL, T.M. Effect of soil amendment on growth and physiological processes of rocket (*Eruca Sativa* L.) grown under salinity conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 10(1): 15-20. 2016.
- JANCZEWSKI, E. Organisation dorsiventrale dans les racines des Orchidees. **Annales des Sciences Naturelles** 2: 1834-1937. 1885.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill Book. 1940.
- KAISER, E. Verfahren zur Herstellung einer tadellosen Glycerin-Gelatine. **Botanisch Zentralb** 180: 25-26. 1880.

- KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology** 27(2): 137-138. 1965.
- KARREMANS, A. P. Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana** 16(2): 219-241, 2016.
- LEITÃO, C. A. E.; DOLDER, M. A. H.; CORTELAZZO, A. L. Anatomy and histochemistry of the nectaries of *Rodriguezia venusta* (Lindl.) Rchb. f. (Orchidaceae). **Flora** 209: 233-243, 2014.
- LERSTEN, N. R.; CURTIS, J. D. Preliminary report of outer wall helices in trichomes of certain dicots. **Canadian Journal of Botany** 55(2): 128–132. 1977.
- LEITGEB H. **Die luftwurzeln der orchideen**. 1850–1918. 1865.
- LIU, L.; DEAN, J. F. D.; FRIEDMAN, W. E.; ERIKSSON, K. E. L. A laccase-like phenoloxidase correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. **The Plant Journal** 6 (2): 213-224. 1994.
- LUER, C. A. Icones Pleurothallidarum III. **Systematics of Pleurothallis (Orchidaceae). Monographs in Systematic Botany** v. 20. Missouri Botanical Garden, Saint Louis, 1986.
- LUQUE, R. L.; SOUSA, H. C.; KRAUS, J. E. Métodos de coloração de Roeser (1972) -modificado- e Kropp (1972) visando a substituição do azul de astra por azul de Alcão 8GS ou 8GX. **Acta Botanica Brasilica** 10(2): 199-212. 1996.
- MA, Z.; BIELENBERG, D. G.; BROWN, K. M.; LYNCH, J. P. Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell and Environment**, 24(4): 459-467. 2001.
- MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.10 <http://mesquiteproject.org>. 2016.
- MCMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. **Biotechnic & Histochemistry**. 23(3): 99-108. 1948.
- MELO, M. C.; BORBA, E. L.; PAIVA, E. A. S. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **Plant Systematic and Evolution** 286(3-4): 141-151, 2010.
- METCALFE, C. R. The leaf: general topography and ontogeny of the tissues. In: Metcalfe CR, Chalk L (eds) **Anatomy of the dicotyledons I**, Clarendon Press: Oxford. 1979.
- MORRIS, M. W.; STERN, W. L.; JUDD, W. S. Vegetative anatomy and systematic of subtribe Dendrobiinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 120(2): 89-114. 1996.
- MOZAHIM, K.; MALLAH, A.; MASYAB, H. M. Expression of GUS and GFP reporter genes in transgenic hairy roots of tomato and potato plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 8(2): 234-239. 2014.
- NIXON, K. C. WinClada ver. 1.00. 08. Published by the author, Ithaca, NY. 2002.
- NOZULAI, M.; KHAIRI, M.; JAHAN, M. S. Effects of different salinity levels on rice production. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 9(5): 524-530. 2015.
- OADES, J. M. Mucilages at the root surface. **European Journal of Soil Science**, 29(1): 1-16. 1978.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma** 59(2): 368-373. 1964.

- OLANTUJI, O. A.; NENGUIM, R. O. Occurrence and distribution of tracheoidal elements in the Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society** 80(4): 357-370. 1980.
- OLIVEIRA, V. D. C.; SAJO, M. D. G. Anatomia foliar de espécies epífitas de Orchidaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, 22(3), 365-374. 1999.
- PACINI, E.; NEPI, M.; VESPRINI, J. L. Nectar biodiversity: a short review. **Plant Systematic and Evolution** 238(1-4): 7-21. 2003.
- PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358. 1996.
- PETERSON, R. L.; FARQUHAR, M. L. Root hairs: Specialized tubular cells extending root surfaces. **The Botanical Review**, 62(1): 1-40. 1996.
- PABST, G. F. J.; DUNGS, F. **Orchidaceae Brasilienses** v.1. Kurt Schmiersow, Hildesheim, 1975.
- PRIDGEON, A. M.; WILLIAMS, N. H. Anatomical aspects of *Dresslerella* (Orchidaceae). **Selbyana**, 5(2): 120-134, 1979.
- PRIDGEON, A. M. Absorbing trichomes in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**. 68(1): 64-71, 1981.
- PRIDGEON, A. M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 69(6): 981 – 938, 1982.
- PRIDGEON, A. M.; STERN, W. L. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 70(8): 1233-1243. 1983.
- PRIDGEON, A. M.; STERN, W. L. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). **Botanical Gazette**, 146(1): 115-123. 1985.
- PRIDGEON, A. M. & CHASE, M. W. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Lindleyana** 16: 235-271, 2001.
- PRIDGEON, A. M.; CRIBB, P. J.; CHASE, M. W.; RASMUSSEN, F. N. (eds.). **Genera Orchidacearum**, v. 4. Oxford University Press, New York, 2005.
- RODRIGUES, V. T. **Sinopse, filogenia e citotaxonomia de *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Barb. Rodr.) Chiron & van den Berg (Orchidaceae)**. 84f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e meio ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.
- RODRIGUES, V. T.; SMIDT, E. C.; BARROS, F. Revisão taxonômica de *Acianthera* sec. *Pleurobotryae* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). **Hoehnea** 42(4): 615-627, 2015.
- RODRIGUES, V. T.; SMIDT, E. C.; BOLSON, M.; BARROS, F. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Botany**. No prelo.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; VAN DEN MARK, P. Mr Bayes 3.1. Manual. Available from: <http://mr bayes.net>. 2005.
- SCATENA VL, NUNES AC (1996) Anatomia de *Pleurothallis rupestris* Lindl. (Orchidaceae) dos campos rupestres do Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo** 15: 35-43
- SERENO PC (2007) Logical basis for morphological characters in phylogenetics. *Cladistics* 23(6): 565–587
- SHI, H.; ZHU, J. K. SOS4, A pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, 129(2): 585–593. 2002.
- SINGER, R. B.; COCUCCHI, A. A. Pollination mechanism in four sympatric southern Brazilian Epidendroideae orchids. **Lindleyana** 14(1):47-56. 1999.
- SINGER, R. B. Orchid pollination: recent developments from Brazil. **Lankesteriana**, 7: 111-114, 2003.

- SWOFFORD, D. L. {PAUP\*. **Phylogenetic analysis using parsimony** (\* and other methods). Version 4.}. 2003.
- STERN, W. T. **Botanical Latin**. Timber Press, Portland. 546p. 2004.
- STERN, W. L.; PRIDGEON, A. M.; LUER, C. A. Stem structure and its bearing on the systematics of Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, 91(4): 457-471. 1985.
- STERN, W. L.; CURRY, K. J.; PRIDGEON, A. M. Osmophores of Stanhopea (Orchidaceae). **American Journal of Botany** 74(9): 1323-1331. 1987.
- STERN, W. L.; MORRIS, M. W.; JUDD, W. S. Anatomy of the thick leaves in *Dendrobium* section *Rhizobium* (Orchidaceae). **International Journal of Plant Sciences** 155(6): 716-729. 1994.
- STERN, W. L. **Anatomy of the Monocotyledons Volume X: Orchidaceae**. Oxford University Press, Oxford. 2014.
- STPICZYNSKA, M. Anatomy and ultrastructure of osmophores of *Cymbidium tracyanum* Rolfe (Orchidaceae). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 62(1-2): 5-9. 1993.
- STPICZYNSKA, M. The structure of nectar of *Platanthera bifolia* L. Orchidaceae. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae** 66(1): 5-11. 1997.
- STPICZYNSKA, M., DAVIES, K. L.; GREGG, A. Comparative account of nectary structure in *Hexisea imbricata* (Lindl.) Rchb.f. (Orchidaceae). **Annals of Botany** 95(5): 749-756. 2005.
- STPICZYNSKA, M.; DAVIES, K. L.; KAMINSKA, M. Comparative anatomy of the nectary spur in selected species of Aeridinae (Orchidaceae). **Annals of Botany**. 107: 327-345. 2011.
- STPICZYNSKA, M.; DAVIES, K. L.; KAMINSKA, M. Diverse labellar secretions in African *Bulbophyllum* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sections *Ptiloglossum*, *Oreonastes* and *Megaclinium*. **Botanical Journal of the Linnean Society** 179(2): 266–287. 2015.
- TEIXEIRA, S. P.; BORBA, E. L.; SEMIR, J. Lip Anatomy and its Implications for the Pollination Mechanisms of *Bulbophyllum* Species (Orchidaceae). **Annals of Botany** 93(5): 499-505. 2004.
- THIELE, K. The holy grail of the perfect character: the cladistic treatment of morphometric data. **Cladistics** 9(3): 275-304. 1991.
- VOGEL, S. **Duftdrüsen im Dienst der Bestäubung über Bau und Funktion der Osmophoren**. Akad. Wiss. Abh. Math.-Naturwiss. K1. 10: 598-763. 1962.
- WOODCOCK, T.; LARSON, B. M. H.; KEVAN, P. G.; INOUE, D. W.; LUNAU, K. Flies and flowers II: floral attractants and rewards. **Journal of Pollination Ecology** 12(8): 63-94. 2014.